

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
KEEMIA INSTITUUT  
ANALÜÜTILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Jaana Heiter

**Polü(stüreen-divinüülbenseen) monoliitsete statsionaarsete faaside  
süntees PEEK kolonnis ja nende testimine**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Chunguang Lu, PhD

Prof Ivo Leito

Tartu 2016

# Sisukord

1	Kasutatud lühendid.....	4
2	Sissejuhatus .....	6
3	Kirjanduse ülevaade .....	7
3.1	Vedelikkromatograafia .....	7
3.2	Vedelikkromatograafias kasutatavad kolonnid .....	7
3.3	Monoliitsed kolonnid.....	8
3.4	Monoliitsete kolonnide ajalugu .....	9
3.5	Monoliitsete kolonnide eelised ja puudused võrreldes täidiskolonnidega .....	10
3.6	Orgaanilised monoliitsed statsionaarsed faasid .....	11
3.7	Monoliitsete kolonnide valmistamine .....	12
3.8	Orgaaniliste monoliitide pooride moodustumine ja poorilised omadused .....	15
3.9	Poorsete omaduste mõjutamine .....	16
4	Eksperimentaalne osa .....	19
4.1	Aparatuur ja töövahendid .....	19
4.2	PEEK pinna modifitseerimine .....	20
4.3	Polü(stüreen-divinüülbenseen) kolonni valmistamine .....	22
5	Tulemused ja arutelu .....	23
5.1	PEEK sisepinna modifitseerimine .....	23
5.2	Adhesiooni test .....	25
5.3	Temperatuuri mõju polümerisatsioonile.....	26
5.4	Lämmastiku adsorptsioon.....	27
5.5	Mikroskoopilised omadused.....	27
5.6	Hüdrodünaamilised karakteristikud ja poorsus .....	28
5.7	Alküülbenseenide lahutamine ning kolonnide reprodutseeritavus .....	29
5.8	Valkude lahutamine .....	32

6	Kokkuvõte .....	33
7	Summary .....	34
8	Kasutatud kirjandus.....	35
9	Lisa .....	39

## 1 Kasutatud lühendid

AIBN	-	2,2'-asobisisobutüroniitil
ATR	-	nõrgendatud täielik sisepeegeldus
BSA	-	veise seerum albumiin
CEC	-	kapillaarelektrokromatograafia
DCE	-	1,2-dikloroetaan
DMAP	-	4-dimetüülaminopüridiin
DVB	-	divinüülbenseen
EDMA	-	etüleenglükoolidimetakrülaad
FT-IR	-	Fourier' teisendusega infrapuna
GMA	-	glütsidüülmetakrülaad
GMA-ko-EDMA	-	polü(glütsidüülmetakrülaad-ko-etüleenglükoolidimetakrülaad)
HPLC	-	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
I.D.	-	sisemine diameeter
k	-	mahtuvusfaktor
kDa	-	kilodalton
N/m	-	teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta
NaBH <sub>4</sub>	-	naatriumborohüdriid
O.D.	-	välimine diameeter
OPP	-	avatud pooridega polüuretaan
PEEK	-	polüeetereeterketoon
PS-DVB	-	polü(stüreen-divinüülbenseen)
Red-Al	-	naatrium bis(2-metoksüetoksü)alumiinum hüdriid
ROMP	-	tsükli avanemise metateespolümerisatsioon

RSD	-	suhteline standardhälve
SEM	-	skaneeriv elektronmikroskoop
SP	-	pundumisvõime
TEA	-	trietüülamiin
Tetraglüm	-	tetraetüleenglükooli dimetüüleeter
THF	-	tetrahüdrofuraan
UV	-	ultraviolet
v/v	-	ruumala ruumala kohta

## 2 Sissejuhatus

Orgaanilised monoliidid on „ühes tükis“ polümeersed materjalid, mida läbib tihe pooride võrgustik. Selliseid materjale on võimalik kasutada vedelikkromatograafias statsionaarse faasina, alternatiivina pakitud osakestega täidiskolonnidele. Tänu kanalilaadsetele pooridele on monoliitidel kõrge läbilaskvus, mistõttu esineb madalam vasturõhk ning on võimalik rakendada kõrgemaid voolukiirusi. Polümeerseid monoliitseid kolonne rakendatakse enamasti makromolekulide lahutamiseks, kuid valmistamise lihtsuse tõttu on huvipakkuv ka nende rakendamine madalmolekulaarsete ühendite lahutamiseks. Käesolevas töös keskenduti monoliitsete polü(stüreen-divinüülbenseen) kolonnide võimele lahutada eelkõige madalmolekulaarseid ühendeid.

Polümeersete monoliitsete kolonnide juures on probleemiks nende pundumine ja kokkutõmbumine sõltuvalt ümbritsevast solvendist – orgaanilises solvendis orgaanilised monoliidid punduvad ning veefaasis tõmbuvad kokku. Selle tõttu võib monoliit kolonni siseseina küljest lahti tulla, mille tagajärjel tekib vedelikule monoliidi ja kolonni seina vahel alternatiivne voolutee ning lahutuse efektiivsus langeb drastiliselt. Selle vältimiseks on oluline monoliitne statsionaarne faas keemiliselt kolonni siseseina külge kinnitada. Enamik orgaanilisi monoliitseid statsionaarseid faase valmistatakse kapillaarides, mille sisediameeter on alla 200 µm, sest suuremas mõõdus on kõrge efektiivsusega monoliitseid kolonne keeruline valmistada. Üheks olulisemaks põhjuseks on see, et suurema diameetriga monoliite on keeruline piisava tugevusega kolonni siseseina külge kinnitada, et vältida kokkutõmbumist polümerisatsiooni ja kromatograafilise analüüsi käigus. Samas on kapillaarsed kolonnid vedelikkromatograafilistes rakendustes kapriissemad ning nende kasutamiseks on vaja spetsiaalset aparatuuri.

Käesoleva töö raames töötati välja uus kolmeetapiline meetod monoliitse statsionaarse faasi kinnitamiseks PEEK kolonni siseseina külge. Meetod koosneb pinna söövitamisest, redutseerimisest ja metakrüleerimisest, misjärel valmistatakse statsionaarne faas sünteesides polüstüreen-divinüülbenseeni monoliidi *in situ* töödeldud PEEK torus. Kolonnid on sisediameetriga 1,6 mm ja pikkusega 12,5 cm ning on kasutatavad tavapäraste HPLC seadmetega. Kolonnide testimiseks lahutati isokraatiliselt alküülbenseenide segu. Välja töötatud meetod monoliitsete kolonnide valmistamiseks on reprodutseeritav. Voolukiirusel 0,1 ml/min oli teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta keskmiselt 18600 – 22200. Optimaalsel voolukiirusel oli kolonni teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta 26000 – 32000.

### **3 Kirjanduse ülevaade**

#### **3.1 Vedelikkromatograafia**

Vedelikkromatograafia on laialdaselt kasutatav meetod keerulistest segudest keemiliste ühendite lahutamiseks, identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks määramiseks. Vedelikkromatograafia meetodeid ja tehnikaid on erinevaid, kuid need kõik kasutavad ainete eraldamiseks statsionaarset ja mobiilset faasi. Vedelikkromatograafias on mobiilseks faasiks vedel solvent, millesse sisestatakse ka proov. Segu komponendid kanduvad mobiilse faasi abil läbi statsionaarse faasi ja ained lahutuvad vastavalt sellele, mil määral nad interakteeruvad statsionaarse faasiga ja läbivad seetõttu kolonni erineva kiirusega. [1]

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) on kõige mitmekülgsem ja laialdasemalt kasutuses olev vedelikkromatograafia tüüp. Seda tehnikat kasutatakse erinevate orgaaniliste, anorgaaniliste ja bioloogiliste materjalide eraldamisel ja määramisel. Vedelikkromatograafia tüüpe eristatakse vastavalt lahutusmehhanismile või statsionaarsele faasile: jaotuskromatograafia (vedelik-vedelik), adsorptsioonkromatograafia (vedelik-tahke), ioonvahetuskromatograafia, suuruseralduskromatograafia, afiinsuskromatograafia ja kiraalne kromatograafia. [1] Sõltuvalt mobiilfaasi ja statsionaarse faasi suhtelistest polaarsustest esineb kahte tüüpi jaotuskromatograafiat: normaalfaas- ja pöördfaas-kromatograafia. Normaalfaas-kromatograafia korral on statsionaarne faas polaarne ning mobiilne faas mittepolaarne. Pöördfaas-kromatograafia korral on statsionaarne faas mittepolaarne (näiteks süsivesinikahelatel põhinev) ning mobiilne faas küllaltki polaarne (enamasti vee, metanooli ja atsetonitriili segud). Hinnanguliselt üle kolme neljandiku kõikidest HPLC lahutamistest tehakse tänapäeval pöördfaasis. [1]

#### **3.2 Vedelikkromatograafias kasutatavad kolonnid**

Statsionaarset faasi sisaldav kolonn on HPLC süsteemi kõige tähtsam osa, sest seal toimub lahutusprotsess. Selleks, et arendada välja toimivat ja reprodutseeritavat meetodit ainete lahutamiseks on vaja ka stabiilset kõrgefektiivset kolonni. Kommertsiaalsed kolonnid erinevad märgatavalt üksteisest, kui need on valmistatud erinevate ettevõtete poolt, samuti võivad erineda sama pakkuja kolonnid, mis peaksid teoreetiliselt olema identsed. Sellised erinevused mängivad suurt rolli soovitava HPLC meetodi välja töötamisel. Kolonnid võivad erineda teoreetiliste taldrikute arvu, piikide sümmeetria, retentsiooni, selektiivsuse ja eluaja poolest. Enamik kasutajaid peavad meetodi arendamisel väga oluliseks kolonn-kolonn

reprodutseeritavust, sest selle puudumisel tuleb iga uue kolonniga meetod uuesti optimeerida. Reprodutseeritavust tõestatakse teoreetiliste taldrikute arvuga (N), selektiivsusega kindla proovi ja tingimuste juures, rõhu ning retentsiooniga (k) mingite kindlate test-analüütide korral. [2]

Vedelikkromatograafia kolonnid valmistatakse enamasti roostevabast terasest ümbrisega, kuid kasutatakse ka klaasist või polümeerist kolonnimaterjale (näiteks PEEK). Tavapäraselt kasutatavad kolonnid on 10 või 15 cm pikad ja sisediaimeetriga 4,6 mm ning pakitud 5  $\mu$ m täidisosakestega. Selliste kolonnide efektiivsus on 40000 kuni 70000 N/m. Tüüpiliselt on kolonnid pakitud poorsete silikageeli baasil täidisosakestega ning seejuures on oluline, et kõik täidisosakesed oleksid võimalikult sarnase suuruse ja kujuga. [1]

### **3.3 Monoliitsed kolonnid**

Poorsed monoliidid on ühes tükis hea läbilaskvusega materjalid, mida kasutatakse kõrgefektiivses vedelikkromatograafias statsionaarse faasina alternatiivina pakitud täidiskolonnile. Kuna tegu on ühes tükis materjaliga, siis puuduvad osakeste vahelised tühimikud, mis esinevad pakitud täidiskolonna korral nii-öelda raisatud ruumalana, kus ei toimu lahutamist. Täidiskolonnide puhul on võimalik osakeste vahelist ruumala vähendada, kasutades väiksema diameetriga täidiseosakesi, kuid seeläbi väheneb ka materjali läbilaskvus ja seetõttu tuleb ainete lahutamiseks rakendada suuremat rõhku. Ühes tükis monoliitsete kolonnidega on saavutatavad võrreldavad lahutamiseefektiivsused olulised madalamatel rõhkudel. [3]

Monoliitseid kolonne jagatakse vastavalt koostisele kahte suurde rühma: orgaanilised polümeersed monoliidid ja anorgaanilised silikageeli põhised monoliidid. Silikageelil põhinevate kolonnidega saab kiirelt ja hea efektiivsusega eraldada väikese molekulmassiga molekule. Orgaanilised polümeersed monoliidid sobivad hästi makromolekulide, nagu valkude, nukleiinhapete ja sünteetiliste polümeeride eraldamiseks. [4] Seega täiendavad orgaaniliste ja anorgaaniliste monoliitsete kolonnide tehnoloogiad üksteist. Nende erinevate lahutusomaduste põhjuseks on erinevus poorsuses. Orgaanilistes monoliitides on tüüpiline, et leidub vähe väikeseid poore ja esineb monomodaalne makropooride jaotus. Silikageelil põhinevatele monoliitidele on tüüpiline bimodaalne poorisuuruste jaotus (makropoorid ja mesopoorid). See mitmekülgsus teeb monoliidid väga huvipakkuvaks alternatiiviks tavapärastele pakitud kolonnidele. [5]



Monoliitseid kolonne on võimalik valmistada erinevates suurustes (mikromeetri mõõtudes [6-7] kuni sentimeetri mõõtudes [8]) ja erineva kujuga [9] ning lahutusefektiivsus võib sellest tugevalt sõltuda. Enamik orgaaniliste monoliitidega tehtud uurimustest on viidud läbi mikrokapillaaridega, läbimõõduga alla 200  $\mu\text{m}$ . Suurema läbimõõduga monoliite on keerukam sünteesida ja üks põhjustest on see, et ei osata monoliiti piisavalt hästi kolonni pinna külge siduda. [3]

Vastavalt suurusele ja funktsioonile on monoliitsetes kolonnides kahte tüüpi poore: läbivoolupoorid ja mesopoorid. Läbivoolupooride põhiline ülesanne on tagada mobiilfaasi läbivool monoliidist. Retentsioon toimub põhiliselt mesopoorides. Suuremate läbivoolupooride tõttu on monoliidid suure läbilaskvusega ja see võimaldab kromatograafilisi lahutamisi viia läbi madalamatel rõhkudel. Väiksemates mesopoorides toimub lahutamine ja nende olemasolu suurendab monoliidi pooride kogupindala. Seega on monoliit kui väikeste mesopooride võrgustik, mis on vastutavad retentsiooni ja lahutamisselektiivsuse eest ning need on omavahel ühendatud suurte läbivoolupooridega, mille tõttu on monoliidil kõrgem läbilaskvus. Seega on võimalik saavutada kiireid lahutamisi suurematel mobiilfaasi voolukiirustel ja mõõdukatel rõhkudel, võrreldes sarnase efektiivsusega täidisosakestega kolonnidega. [10]

### **3.4 Monoliitsete kolonnide ajalugu**

1950. aastatel pakkus Nobeli preemia laureaat Robert Synge [11] välja sellise struktuuriga materjali, mis oli sarnane tänapäeval monoliidi nime all tuntavale materjalile. Samas ta taipas, et niisugused pehmed materjalid, mis olid sellel ajal saadavad, kollapseeruksid kõrge hüdrostaatilise rõhu toimetel. Kubin *et al.* kinnitasid seda 15 aastat hiljem, kui testisid monoliiti, mis oli valmistatud 2-hüdroksüetüülmetakrülaad hüdrogeelist, mille läbilaskvus oli väga halb. [4] Sellist tüüpi materjalide arendamisel oli suur samm edasi avatud pooridega polüuretaan (OPP) vahtude valmistamine *in situ* polümerisatsioonil. [5] OPP vahtude abil oli edukalt võimalik gaasikromatograafiliselt lahutada madala molekulmassiga analüüte, kuid nende kasutamine oli halva termilise stabiilsuse tõttu piiratud. Kokkuvõtteks, ükski eelnevalt kirjeldatud tehnoloogiatest ei kestnud kaua ja praktiliselt kasutatavate monoliitsete kolonnide ajastu algas palju hiljem. [4]

1980. aastate keskel uurisid Belenkii ja tema kaastöötajad metakrülaatseid makropoorseid polümeerseid membraane. [5] Nad suutsid edukalt lahutada valke lühikeste monoliitsete kolonnidega. Polümeersete membraanide valmistamiseks segati metakrülaat-monomeer,

dimetakrülaat-põiksidestaja, vabaradikaalne initsiaator ja poorimoodustaja solvent. Saadud poorne polümeer eemaldati seejärel vormist ja viilutati väikesteks ketasteks, mis asetati padrunisse ning kasutati kromatograafiliseks eraldamiseks.

1990. aastate algul publitseerisid Svec ja Frechet oma esimese artikli jäikadest pidevatest polümeeri varrastest (*rigid, continuous polymer rods*). [12] GMA ja EDMA polümeriseeriti poorimoodustajast solventide juuresolekul kolonniümbrises mõõtudega 30 x 8 mm (I.D.), kasutades termiliselt initsieeritud vaba-radikaalset polümerisatsiooni. Polümerisatsiooni ja sellele järgnenud töötamise tulemusena saadi kolonnid, mida kasutati valkude lahutamiseks. Kuigi saavutatud lahutused ei olnud muljeltavaldavalt efektiivsed ega kiired, oli üldine monoliitsete materjalide rakendatavus selle tööga demonstreeritud.

Pärast edukat metakrülaatsete monoliitsete kolonnide valmistamist, laiendas Svec'i grupp oma tööd ka stüreenile, divinüülbenseenile ja nende derivaatidele. [13] 1990ndatel valmistasid Fields [14] ja Tanaka [15] anorgaanilisi, silikageelil baseeruvaid, monoliitseid materjale.

### **3.5 Monoliitsete kolonnide eelised ja puudused võrreldes täidiskolonnidega**

Monoliitsetel statsionaarsetel faasil on mitmeid eelised võrreldes teralise täidisega. Monoliitsel kolonnal on kõrge poorsus ning poorid paiknevad võrgustikuna üle terve monoliidi. [16] Tänu läbivoolupooridele on monoliitidel täidiskolonnidest parem läbilaskvus, mistõttu on monoliitse kolonni puhul vasturõhk madalam. Suurema läbilaskvuse tõttu on võimalik kasutada suuremaid voolukiirusi ja see lühendab analüüsiaega, mis on oluline kriteerium rutiinanalüüsides. [17] Kolonni pakkimisel teralise täidisega üritatakse kasutada aina väiksemaid täidisosakesi, et saavutada kõrgemat efektiivsust. [18] Samas, kui osakesed on väga väikesed, siis on vasturõhk väga suur ja mobiilse faasi liikumiseks läbi kolonni on vaja rakendada suurt rõhku. Võrreldes pakitud kolonniga on monoliitsel kolonnal ka kõrgem massiülekanne kiirus. [16] See tähendab, et mobiilse ja statsionaarse faasi vahel toimub rohkem interaktsioone. Kui voolukiiruse kasvades täidiskolonni teoreetiliste taldrikute kõrgus samuti kasvab, siis monoliidi puhul voolukiiruse suurenedes kasvavad teoreetiliste taldrikute kõrgused aeglasemalt ja võimalik on kasutada suuremaid voolukiirusi ilma, et efektiivsus oluliselt langeks. [16] Orgaanilisi monoliitseid kolonne on küllaltki lihtne *in situ* polümerisatsioonil valmistada, seda eriti kapillaarsete kolonnide korral, mida on ebamugav osakestega täita. [5] Kuna polümeeri saab polümerisatsiooni käigus keemiliselt seinte külge

kinnitada, siis monoliitne statsionaarne faas ei vaja fritte, mis on kasutusel täidiskolonnides takistamaks täidisosakeste kolonnist välja lekkimist. [5] Lisaks on monoliitsed kolonnid vastupidavamad kolonni saastumisele, mistõttu ei pea analüüsiv proov olema niivõrd puhas kui täidiskolonni korral. [16] Tüüpilised täidiskolonnid koosnevad silikageeli osakestest, mis on tundlikud kõrge pH suhtes ning seetõttu ei saa neid kolonne kasutada, kui pH on üle 10, mis on probleemiks ravimite analüüsil. See kehtib ka silikageeli põhiste monoliitide korral. Samas saab orgaanilisi monoliitseid kolonne (näiteks polü(stüreen-divinüülbenseen) põhiseid) kasutada pH vahemikus 1 – 14, mistõttu saab neid rakendada ka sellistes analüüsides, kus on tegu ekstreemsemate pH väärtustega. [19]

Monoliitsetel kolonnidel on ka puudusi. Probleemiks on orgaanilise monoliidi pundumine või kokkutõmbumine sõltuvalt ümbritsevast solvendist. Kõrge veesisaldusega mobiilses faasis kipuvad monoliitsed statsionaarsed faasid kokku tõmbuma, mistõttu võivad need kolonni seinte küljest lahti tulla ning mobiilne faas saab voolata monoliidi ja seina vahelt, mis toob kaasa efektiivsuse languse. [20] Enamik monoliitseid kolonne valmistatakse kapillaarmõõtmetes [3], sest suuremates mõõtmetes monoliitsete kolonnide valmistamine on keerukam tekkiva temperatuurigradiendi [16] ning kolonni seinte külge kinnitamise vajaduse tõttu. Monoliitsete kolonnide juures on ka suur Eddy difusiooni panus teoreetilise taldriku kõrgusesse. [16] Seega on oluline, et valmistatav monoliit oleks võimalikult homogeenne. Madalam efektiivsus võib tuleneda poorsuse ja läbilaskvuse süstemaatilistest erinevustest kolonni diameetri lõikes, mistõttu elueeruv komponent ei läbi kolonni mitte sirge vaid kaarja frondiga.

Praegusel ajal on monoliitsed kolonnid siiski üldjuhul täidiskolonnidega võrreldes madalamate efektiivsustega. Põhjuseks võib olla see, et täidiskolonni valmistamise protsess on paremini kontrollitav võrreldes monoliitse kolonni valmistamisega. Kui täidiskolonni korral osakesed valmistatakse, sõelutakse suuruse järgi, funktsionaliseeritakse ja pakitakse eri etappides siis polümeerse monoliidi korral toimub see kõik ühe reaktsioonina, mis küll lihtsustab valmistamisprotseduuri, kuid teisalt raskendab omaduste kontrolli.

### **3.6 Orgaanilised monoliitsed statsionaarsed faasid**

Orgaanilisi monoliite valmistatakse enamasti monofunktsionaalse ja bifunktsionaalse orgaanilise ühendi kopolümeerisatsioonil sobiva initsiaatori ja poorimoodustaja juuresolekul. [5] Orgaanilisi monoliitseid statsionaarseid faase saab jagada nelja erinevasse keemilisse perekonda: stüreeni-, (met)akrülaadi-, akrüülamiidi- ja norborneeni-põhised.

Viimaste aastakümnete jooksul on kopolümeriseeritud mitmesuguseid selliseid monomeere ja põiksidestajaid kasutades erinevaid polümerisatsioonitehnikaid ja initsiaatoreid.

Erinevaid orgaanilisi monoliitseid kolonne on võimalik valmistada, kasutades erinevaid polümerisatsioonimeetodeid ja initsiaatoreid. Kõige levinumaks meetodiks on vabaradikaalne kopolümerisatsioon. Vabad radikaalid tekivad sobivate ühendite termilisel, fotokeemilisel või keemilisel lagunemisel. Teised polümerisatsiooni tehnikad on ROMP (*ring opening metathesis polymerization*), soojusega initsieeritav polükondensatsioon, gamma-kiirguse abil teostatav polümerisatsioon ja soojusega initsieeritav polüliitumine. [5]

Kuigi polümerisatsiooni läbiviimise viise ja erinevaid monomeeride kombinatsioone on palju, on saadava polümeeri struktuur ja morfoloogia üllatavalt sarnased. [5] Sõltumata sellest, millist vabaradikaalset polümerisatsiooni kasutada, on saadav orgaaniline monoliit sarnane – omavahel ühendatud polümeeriosakeste kobar, mida läbivad mikromeetri mõõdus voolukanalid. Tüüpiliselt kirjeldab orgaanilise monoliidi poorsust monomodaalne makropooride jaotus. Selline poorisuuruste profiil võimaldab orgaanilisi monoliitseid statsionaarseid faase kasutada suure molekulmassiga ühendite kiireks ja kõrg-efektiivseks lahutamiseks, mis teeb sellest võimsa töövahendi bio-analüütilises keemias.

### **3.7 Monoliitsete kolonnide valmistamine**

#### **3.7.1 Kolonnide eeltöötlus**

Orgaanilised polümeeri baasil statsionaarsed faasid kipuvad solvendi mõjul punduma või kokku tõmbuma. [20] Kokkupuutel orgaanilise solvendiga monoliit pundub ehk imab endasse lahustit. Seega on nii-öelda parema solvendi korral (solvent, millel on suurem solvateeriv jõud) polümeeri ja lahusti vahel tugevamad interaktsioonid, mistõttu monoliit on rohkem solvateeritud ning esineb vähem kontakte polümeeri erinevate osade vahel. Kui kasutada nii-öelda halvemat solventi, mille solvateeriv jõud on väiksem (orgaanilise monoliidi korral näiteks vesi), siis kasvab polümeeri segmentide vahel interaktsioonide arv ja selle tõttu tõmbub monoliit kokku. [21] See võib viia tühimike tekkeni statsionaarse faasi ja kolonni siseseina vahel, mille kaudu saab osa mobiilfaasi voolata ilma statsionaarse faasiga oluliselt vastasmõjus olemata. Samuti võib juhtuda, et statsionaarne faas pressitakse kokku ja kolonni ülaossa tekib tühik. Mõlemad olukorrad alandavad dramaatiliselt lahutuse efektiivsust. [5] Selliste olukordade vältimiseks tuleb kolonni sisepinda selliselt modifitseerida, et polümerisatsioonil kinnituks monoliit keemiliselt seina külge. See protseduur ei mõjuta küll polümeeri pundumus- või kokkutõmbumisomadusi, kuid võimaldab vältida olukorda, kus

polümeer surutakse kokku, nii et tekivad tühimikud statsionaarse faasi ja kolonni seina vahel või statsionaarse faasi ülaosas. [5]

Suurema läbimõõduga kolonne valmistatakse tavaliselt otse roostevabast terasest ja plastikust torudesse, ilma kovalentse sidumiseta. Roostevaba terase pinna karedus ja plastiku nõrgad mittekovalentsed interaktsioonid on enamasti piisavad, et hoida monoliiti paigal. Samas peab monoliit olema kasutamise jaoks osaliselt orgaanilisest solvendist pundunud ning vett sisaldavate lahustega töötamisel võivad tekkida monoliidi ja seina vahel kanalid, mis drastiliselt alandavad lahutuse efektiivsust. Lisaks võib kolonn laguneda ja gradientlahutamise korral lekkida detektorisse. Seetõttu on oluline leida meetodeid polümeerse monoliitide kovalentseks kinnitamiseks kolonni siseseina külge. Polümeerse monoliidi kovalentne sidumine kolonni külge parandab kolonni mehaanilist stabiilsust ja vastupidavust erinevatele solventidele. [3]

#### **3.7.1.1 PEEK kui kolonni materjal**

Polüetereeterketoon ehk PEEK on semikristalliline termoplastik, millel on suurepärased termilised ja mehaanilised omadused ning lai keemiline vastupidavus. Tänapäeval kasutatakse PEEK materjali laialdaselt kromatograafi erinevates detailides, näiteks kolonni materjalina, voolikutes ja ühenduslülides. Paljude aastate vältel ei olnud üritatud polümeerse statsionaarset faasi kinnitada kovalentselt PEEK kolonni seinte külge. Ilmselt oli selle põhjuseks arvamus, et PEEK on materjalina sellise kinnitamise jaoks keemiliselt liiga vastupidav. Täna on leitud meetodeid, kuidas modifitseerida PEEK materjali niimoodi, et selle külge saaks monoliiti kinnitada. [3] Seda on tehtud läbi PEEK struktuuris olevate aromaatsete tuumade sulfoneerimise [22] ja nitreerimise [23] ning samuti ka bensofenooni osas oleva karbonüülrühma derivatiseerimise [24-26] kaudu. 2011. aastal avaldati patent, kus oli kirjeldatud meetodit stüreenipõhise monoliidi kovalentseks kinnitamiseks PEEK toru külge alustades karbonüülrühmade redutseerimisest PEEK pinnal. [3] 2012. aastal kinnitasid Shu *et al.* keemiliselt laurüül metakrülaats monoliidi 1 mm läbimõõduga PEEK toru külge. [27]

#### **3.7.2 Monoliidi materjalid**

Koostise poolest on orgaanilistest monoliitidest levinuimad polü(stüreen-divinüülbenseen), polümetakrülaat ja polüakrüülamid, neist kaks esimest on ka kommertsiaalselt kättesaadavad (lisaks anorgaanilistele silikageelsetele monoliitidele). [28]

Klassikalisi stüreenipõhiseid monoliite valmistatakse termiliselt initsieeritud stüreeni ja DVB kopolümerisatsioonil (initsiaatoriks AIBN või bensoüülperoksiid). Saadav monoliit on mehaaniliselt stabiilne ja hüdrofoobne statsionaarne faas pöördfaas-kromatograafia jaoks, mida saab lisaks kasutada ka ioon-paar kromatograafia ja kapillaarelektrokromatograafia rakendusteks. [5] Kuna polü(stüreen-divinüülbenseen) on hüdrofoobsete omadustega saab selliseid monoliitseid statsionaarseid faase kasutada otse pöördfaaskromatograafilisteks eraldamisteks ilma modifitseerimiseta. [29]

Metakrülaatseid monoliite valmistatakse vabaradikaalsel polümerisatsioonil erinevatest metakrülaatsetest monomeeridest ja põiksidestajatest, mille tulemusena saadakse erinevate omadustega kolonne mitmesugusteks rakendusteks. Erinevalt stüreeni-põhistest monoliitidest, saab metakrülaatsed polümeere valmistada nii termiliselt, kui ka fotokeemiliselt ja keemiliselt initsieerimiselt. [5] Metakrülaatsed monoliidid on mõõdukalt polaarsed ning saadava monoliitse materjali polaarsus sõltub sellest, millist monomeeri kasutada. [30] Üks populaarsemaid metakrülaatsed monomeere on glütsidüülmetakrülaat (GMA), mis sisaldab endas reaktiivseid epoksürühmi, tänu millele on võimalik viia monoliidi külge erinevaid funktsionaalrühmi ning saada erinevate omadustega statsionaarseid faase. [31]

### **3.7.3 *In situ* polümerisatsiooni tehnikad**

Monoliitsete kolonnide juures viitab termin *in situ* sellele, et polümerisatsioon toimub HPLC kolonni seinte vahel või kapillaaris. Jäiga makropoorse monoliitse kolonni valmistamine mõne orgaanilise polümeeri baasil on küllaltki lihtne võrreldes anorgaaniliste monoliitide valmistamisega. Erinevalt orgaanilistest polümeersetest monoliitsetest kolonnidest ei ole võimalik silikageelil põhinevaid monoliitseid kolonne valmistada *in situ*, sest tahenemisel tõmbuvad nad kokku. Tüüpiline polümerisatsioonisegu sisaldab endas monomeeri, põiksidestajat, vaba-radikaalset initsiaatorit ja vähemalt ühte, kuid enamasti kahte inertset poorimoodustajat solventi. Pärast ühendite lahustamist ultrahelivannis, viiakse degaseeritud polümerisatsiooni segu kolonni. Monoliitide valmistamiseks on kasutatud palju erinevaid kolonni suurusi ja materjale, nagu näiteks roostevaba teras, PEEK, klaas, kusjuures kõige levinumad on sulatatud kvartsist kapillaarid. [5]

Pärast polümerisatsioonisegu ülekandmist kolonni, suletakse see mõlemast otsast ja viiakse vajalikele tingimustele – näiteks kuumutatakse valitud temperatuurile või rakendatakse UV-kiirgust. Pärast polümerisatsiooni lõppu lisatakse kolonnile vajalikud ühenduslülid ning kinnitatakse pumba külge, mille abil pestakse kolonni sobiva solvendiga, et eemaldada monoliidi pooridest poorimoodustaja ja mittereageerinud monomeerid. [5]

Kõige levinum polümerisatsiooni tehnika on vaba-radikaalne soojusega initsieeritud monovinüülse ja divinüülse ühendi *in situ* kopolümerisatsioon. [5] Initsiaatorina on sageli kasutusel AIBN ning polümerisatsiooni temperatuur jääb vahemikku 55 kuni 80 °C. Vaba-radikaalset reaktsiooni on võimalik initsieerida ka vastavate fotoinitsiaatoritega. UV-initsieerimine saab toimuda ainult juhul, kui kolonni sein materjal laseb UV kiirgust läbi, näiteks klaastorudes ning sulatatud kvartsist kapillaarides. Lisaks on vabasid radikaale võimalik initsieerida ka keemiliselt.

### **3.8 Orgaaniliste monoliitide pooride moodustumine ja poorilised omadused**

Kuna termiliselt initsieeritud vaba-radikaalne kopolümerisatsioon on kõige kasutatavam meetod orgaaniliste monoliitsete statsionaarsete faaside valmistamiseks, siis keskendutakse järgnevalt just selle meetodi korral toimivale pooride moodustumise mehhanismile.

Jäiga makropoorse statsionaarse faasi valmistamiseks on polümerisatsioonisegus tüüpiliselt monomeer, põiksidestaja, poorimoodustaja ning initsiaator. [5] Polümerisatsioonisegus olev initsiaator laguneb kindlatel füüsikalistel tingimustel (kuumus, UV-kiirgus) ja tekivad vabad radikaalid, mis kutsuvad lahuses esile monomeeri ja põiksidestaja molekulide polümerisatsiooni. Polümerisatsiooni käigus tekkinud tuumik hakkab sadestuma, kui see muutub reaktsioonikeskkonnas mittelahustuvaks (see sõltub tugevasti poorimoodustaja solventidest, molekulaarmassist ja polümeeri hargnevusest). Seda polümerisatsiooni etappi nimetatakse geelpunktiks ja see märgib üleminekut vedelast tahkelaadsesse olekusse. Kuna esineb ka faaside eraldumine, siis toimub polümerisatsioon edasi nii lahuses kui ka pundunud tuumikutes. Viimastes on polümerisatsioon termodünaamiliselt eelistatum, sest monomeeri ja põiksidestaja kogus pundunud tuumikus on suurem, kui seda ümbritsevas lahuses. Sadestunud mittelahustuv tuumik kasvab seega ühteaegu nii polümerisatsiooni tõttu mikroosakestes kui ka polümeeriahelate adsorptsiooni tõttu ümbritsevast lahusest. Kõrge põiksidestaja sisaldus takistab polümeerigloobulitel kokku minemast ja aitab säilitada nende kerakuju.

Reaktsiooni edenedes polümeeri osakesed reageerivad enda vahetus läheduses olevate teiste polümeeri osakestega ja moodustuvad polümeeriklastrid. Need klastrid on hajutatult vedelas poorimoodustaja segus kuni nad jätkuva polümerisatsiooni mõjul suurenevad ja saavad omavahel kokku, mille tulemusena moodustub tellingute laadne struktuur (*scaffolding structure*), mis läbib kogu poorimoodustaja segu. Sarnaselt polümeeriklastritele on polümeersete tellingute kasv sõltuv põiksidestaja reageerimisest, mis tekitab keemilise

sidestatuse klastrite vahel. Lõpuks on klastrid piisavalt suured, et nad puutuvad teiste klastritega kokku, mille tulemusena moodustub tellingutelaadne omavahel seotud maatriks. See maatriks tugevneb edasiste põiksideamiste ja lahuses olevate polümeeriahelate liitumise tulemusena kuni kõik monomeerid on reageerinud ja lõplik polümeeri võrgustik tekkinud. [5]

Monoliitse polümeeri poorsus on seega defineeritav kui ruum polümeemis, mis on hõivatud poorimoodustaja ja ebatäieliku reaktsiooni korral reageerimata jäänud monomeeri ning põiksideajaja poolt. Saadud üldist poorsust saab mõjutada, näiteks poorimoodustaja solventide valiku ja koostisega ning samuti ka põiksideajaja kogusega. [5]

### **3.9 Poorsete omaduste mõjutamine**

#### **3.9.1 Monomeeri ja põiksideajaja suhte mõju**

Kui suurendada põiksideajaja kogust monomeeri suhtes, siis poori suurus väheneb, samas, kui pooride pindala suureneb. Põiksideajaja kogus mõjutab poorseid omadusi vastavalt eespool välja pakutud pooride moodustumise mehhanismile. Kui suurendada põiksideajaja osakaalu, siis on polümeer rohkem hargnenud ja sadeneb välja varasemas staadiumis. Rohkem põiksideajastunud gloobulid punduvad vähem ning seega sisaldavad ka vähem monomeere. Kui polümeeri gloobulis on vähem lahustunud monomeere, siis väheneb ka polümeeri osakese lõplik suurus. Samas on siis ümbritsevas solvendis polümerisatsiooni aste võrdlemisi kõrge. Suur kogus hästi solvateeritud monomeeri lahuses põhjustab seda, et polümeeriahelad adsorbeeruvad sadestunud polümeerigloobulitele madalama tõenäosusega. Suureneva põiksideajaja osakaaluga väheneb seega keskmine gloobuli diameeter polümeeri skeletis, mille tulemusena on gloobulite vahelised tühimikud ja ka pooride suurused väiksemad. [5]

#### **3.9.2 Poorimoodustajast solvendi mõju**

Orgaanilistes polümeersetes monoliitides on kirjeldatud pooride moodustumise põhjusena väikeste polümeeri tuumikute faasialdust, sest nad ei lahustu ümbritsevas polümerisatsiooni segus. Faasialdus sõltub nii poorimoodustaja solvendi võimest lahustada endas kasvavat tuumikut kui ka polümeeri hargnevuse astmest. Konstantse põiksideajaja koguse juures sõltub faasi eraldumise aeg ainult poorimoodustaja valikust ja koguste suhtest. [5] Mida vähem poorimoodustajast solvent ja kasvav kopolümeeri süsteem kokku sobivad, seda suurem on tekkival polümeeril keskmine poori suurus [32] GMA-ko-EDMA monoliidi korral on tsükloheksanool kõrgema hüdofiilsuse tõttu parem solvent võrreldes 1-dodekanooliga. Sarnane omadus on ka PS-ko-DVB monoliitide korral. PS-ko-DVB suhtes on 1-dodekanool madalama lahustava võimega solvent kui toluen, mis lahustab suurepäraselt stüreenideid



polümeere. Taaskord, mida kõrgem polümeeri lahustumisvõime on porogeensel solvendil (tolueeni lisamine 1-dodekanoolile), seda väiksema poori suurusega monoliit saadakse. [5]

Nõrgema solvendi lisamine põhjustab seda, et faasi eraldamine toimub varakult ning sadestunud polümeeri tuumikud punduvad monomeeridega, mis solvateerivad polümeeri paremini kui poorimoodustaja. Kõrge monomeeri kontsentratsioon globulis tähendab, et seal on polümerisatsiooni aste kõrgem võrreldes ümbritseva lahusega, mis põhjustab tuumiku suuruse kiiret kasvu. Lisaks adsorbeeruvad suure tõenäosusega keemiliselt sarnaste globulite külge lahuses tekkinud polümeeri ahelad, mistõttu need suurenevad veelgi. Samas polümeeri hästi lahustava solvendi lisamine põhjustab seda, et faaside eraldumine toimub polümerisatsiooni hilisemas staadiumis, kuna parem poorimoodustajast solvent konkureerib monomeeridega sadestunud globulite solvateerimisel. Selle tulemusena tuumikute kasv aeglustub ning polümerisatsioon lahuses on eelistatud. Tekkivad polümeeri ahelad adsorbeeruvad preglobulitele madalama tõenäosusega. Seega poorne monoliit, mis on valmistatud polümeeri hästi lahustava solvendiga sisaldab üldiselt väiksemaid mikroglobuleid, mis moodustavad klastreid kitsamate pooridega. [5]

Kuna poorimoodustaja või poorimoodustaja segu võimet lahustada kindlat polümeerisüsteemi pole võimalik usaldusväärselt ilma eksperimendita ennustada, siis poorimoodustaja mõju monoliitse materjali poorsusele on vägagi empiiriline. [5]

### **3.9.3 Polümerisatsiooni temperatuuri mõju**

Mida madalam on polümerisatsiooni temperatuur, seda suuremad on tekkivad poorid monoliidis. Temperatuuriga poori omaduste mõjutamine võib olla väga kasulik, sest see võimaldab kontrollida monoliidi pooride suurust ilma polümerisatsioonisegu muutmata. Samas madalaim temperatuur, mida saab polümerisatsiooniks rakendada sõltub kasutatava vaba-radikaalse initsiaatori lagunemiskiirusest. [33] Mida kõrgem on temperatuur, seda kiiremini initsiaator laguneb ja seda rohkem vabu radikaale on lahuses. Selle tulemusena polümeeri ahelate ja sadestuvate globulite hulk faasieraldushetkel kasvab. Suur arv mikroglobuleid konstantse monomeeri ja põiksidestaja sisalduse juures põhjustab väiksemaid tuumikute diameetreid, mistõttu on ka globulite ja klastrite vahelised tühimikud väiksemad. [5]

### **3.9.4 Initsiaatori mõju**

Initsiaatori valik ja kogus mõjutavad oluliselt valmiva monoliidi poorsust, sest initsiaatorite lagunemise kiirused on samal temperatuuril erinevad. Näiteks kui asendada AIBN

bensoüülperoksiidiga, siis poorisuuruse jaotus liigub suuremate pooride suunas, sest bensoüülperoksiidi lagunemise kiirus on neli korda aeglasem kui AIBN oma. AIBN puhul, mis on kõige enam kasutatav initsiaator, on lagunemise poolestusaeg stüreenis umbes 6 tundi 70 °C juures ja 110 °C juures on see umbes 3 minutit. Initsiaatori tüübi mõju põhineb seega samal seletusel kui polümerisatsiooni temperatuuri mõju konstantsel initsiaatori kontsentratsioonil. Mida kõrgem on lagunemise kiirus, seda rohkem polümeeriahelaid lahuses tekib, mille tulemusena tekib palju sadestunud mikrogloobuleid ja tekivad väiksed tühimikud nende vahel. Teine parameeter, mis mõjutab poorisuuruse jaotust ning käitub samal põhimõttel on initsiaatori kogus polümerisatsiooni segus. Mida kõrgem on initsiaatori suhteline sisaldus, seda väiksem on keskmine pooride suurus monoliidis pärast täielikku polümerisatsiooni. [5]

### **3.9.5 Polümerisatsiooni aja mõju**

Polümerisatsiooni aja abil on samuti võimalik mõjutada termiliselt initseeritud kopolümeeride omadusi. Mõju uurimiseks on valmistatud sama koostisega polümeere erineva polümerisatsiooni aja jooksul ning seejärel uuritud saadud poorsusi. [5] Polümerisatsiooni aeg mõjutab pigem poorijaotuse kuju, kui et liigutab seda mõne teise pooridiameetri suunas. Kui vähendada polümerisatsiooni aega, siis tüüpiline monomodaalne makropoori jaotus muutub samm-sammult laiaks bimodaalseks jaotuseks.

## 4 Eksperimentaalne osa

### 4.1 Aparatuur ja töövahendid

#### 4.1.1 Kasutatud kemikaalid ja vahendid

Naatriumborohüdriid ( $\text{NaBH}_4$ , 99%), naatrium bis(2-metoksüetoksü)alumiinum hüdriidi lahus (Red-Al, >60% toluenis), stüreen (>99%), divinüülbenseen (DVB), 80%), alumiiniumoksiid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), 2,2'-asobisisobutüronitriil (AIBN, 98%), 1-dodekanool (>98%), toluen (99,8%), atsetoon (>99%), tetraetüleenglükooldimetüüleeter (tetraglüm, >99%), väävelhape (95-97%), metakrüülanhüdriid (94%), trietüülamiin (TEA, >99,5%), 4-(dimetüülamino)püridiin (DMAP, >99%), 1,2-dikloroetaan (DCE, 99,8%), trifluoroäädikhape (TFA), naatriumhüdroksiid (NaOH), vesinikkloriidhape (HCl), metanool, heksaan, tiourea (>99,0%), benseen (99,8%), etüülbenseen (>99,0%), propüülbenseen (analüütiline standard), butüülbenseen (analüütiline standard) ja pentüülbenseen (analüütiline standard) olid ostetud ettevõttest Sigma Aldrich (Saksamaa). Tetrahüdrofuraan (>99,9%, SPS grade) oli ostetud ettevõttest Romil Ltd (UK). Veise seerumi albumiin (BSA) päritoluks oli GE Healthcare (Suurbritannia), papaiin pärines firmalt Boehringer Mannheim GmbH (Saksamaa) ja trüpsiin ettevõttest Corning (USA). Atsetonitriil (HPLC puhtusega, >99,9%) osteti ettevõttest Lab-Scan (Poola). Kõikide eksperimenti läbiviimiseks kasutati Tüüp I deioniseeritud vett Milli-Q Advantage A10 süsteemist (Millipore, Bedford, USA). Stüreen ja divinüülbenseen puhastati enne kasutamist alumiiniumoksiidi abil inhibiitoritest. PEEK toru (3,18 mm O.D.  $\times$  1,59 mm I.D.) ja PEEK ühenduslülid osteti ettevõttest VICI AG International (Šveits).

#### 4.1.2 Kasutatud instrumendid

Infrapuna-spektrite registreerimiseks kasutati Nicolet 6700 FT-IR spektromeetrit, mis oli varustatud teemantkristalliga mikro-ATR seadmega „Smart Splitpea“ (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), millest on täpsem ülevaade kirjanduses. [34]

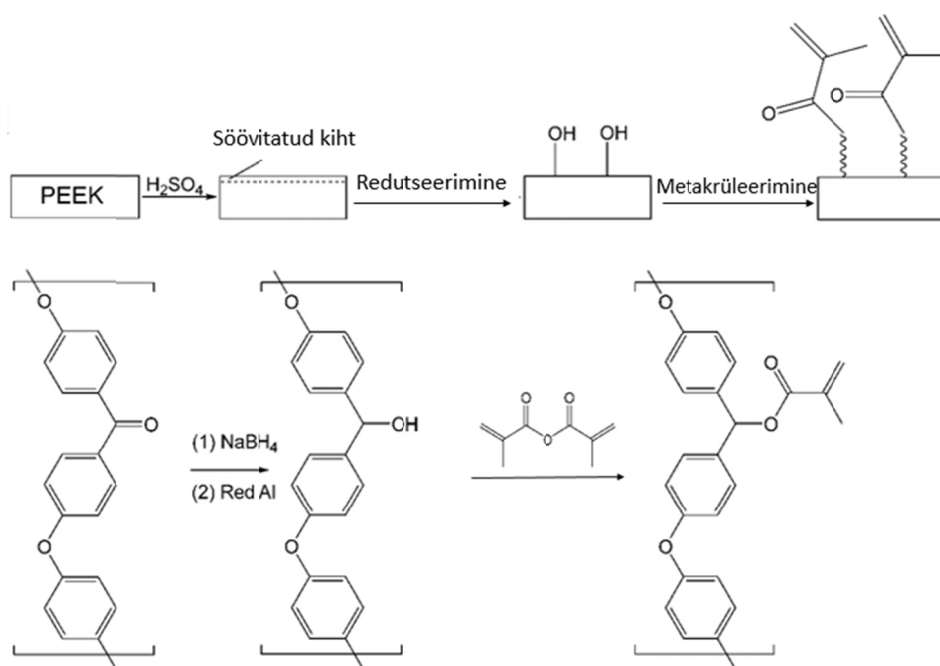
Valmistatud polü(stüreen-divinüülbenseen) monoliitide morfoloogiat uuriti skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM) EVO MA15 (ZEISS, Saksamaa). Mõõtmised viisid läbi Kalle Kirsimäe ja Peeter Paaver.

Lämmastiku adsorptsiooni eksperimentid viidi läbi ASAP 2020 füüsikalise sorptsiooni analüsaatoriga (Micromeritics, USA). Mõõtmised viis läbi teadur Heisi Kurig.

Kromatograafilisteks eksperimentideks kasutati Agilent 1200 HPLC süsteemi, mis koosnes degasaatorist, kvarternaarsest pumbast, autosamplerist, kolonni termostaadist ja dioddrivi detektorist (Waldbronn, Saksamaa). Kõikideks lahutamisteks kasutati 100-125 mm pikkuseid kolonne temperatuuril 298,15 K. Süstitav ruumala oli 0,5 µl ja detekteerimise lainepikkus 210 nm. Madalmolekulaarsete analüütide lahutamine viidi läbi isokraatiliselt pöördfaas-režiimis kasutades mobiilse faasina atsetonitriil-vesi 70:30 (v/v) segu joonkiirusel 0,65 mm s<sup>-1</sup>. Proovi valmistamiseks lahustati analüüdid mobiilses faasis. Benseeni ja alküülbenseenide kontsentratsioonid olid 150 µg/ml ja tiouureal 10 µg/ml. Valkude lahutamine viidi läbi kasutades lineaarset gradienti, kus atsetonitriili sisaldust vees muudeti 28% kuni 48% (v/v) 18 minuti jooksul (mobiilfaasi joonkiirus 2,5 mm s<sup>-1</sup>). Valkude kontsentratsioonid olid 1-3 mg/ml. Valkude lahutamise korral sisaldasid nii atsetonitriil kui ka vesi 0,1% (v/v) trifluoroäädikhapet.

## **4.2 PEEK pinna modifitseerimine**

PEEK toru sisepinna modifitseerimiseks kasutati kolmeetapilist protseduuri (Joonis 1). Esmalt söövitati sisepinda kontsentreeritud väävelhappega. Teiseks redutseeriti söövitatud kiht, mille tulemusena muutusid karbonüülrühmad hüdroksüülrühmadeks. Redutseerimine toimus kahes etapis. Esmalt kasutati NaBH<sub>4</sub> lahust DMSO-s ning lõplik redutseerimine viidi läbi kasutades Red-Al ehk naatrium bis(2-metoksüetoksü)alumiinium hüdriidilahust tetraglüümis. Kolmanda etapina kinnitati PEEK pinnale vinüülrühmad metakrüleerimise teel, kasutades metakrüülanhüdriidi.



**Joonis 1** PEEK toru sisepinna modifitseerimise skeem

#### 4.2.1 PEEK toru sisepinna söövitamine

20 cm pikkune PEEK toru (3,18 mm O.D. x 1,59 mm I.D.) pesti põhjalikult atsetooniga ning kuivatati 4 tunni jooksul vaakumis toatemperatuuril. Toru sisepinda töödeldi 2 ml kontsentreeritud väävelhappega, surudes seda süstla abil kiiresti läbi PEEK toru. Seejärel loputati toru põhjalikult deioniseeritud vee ja metanooliga ning kuivatati vaakumi abil 4 tunni jooksul ning hoiustati argooni keskkonnas.

#### 4.2.2 PEEK toru sisepinna karbonüülrühmade redutseerimine hüdroksüülrühmadeks

Katseklaasi valmistati  $\text{NaBH}_4$  lahus DMSO-s kontsentratsiooniga 1,2 g/100 ml. Eelnevalt söövitatud sisepinnaga PEEK toru kasteti üleni redutseerivasse lahusesse ning katseklaasi kuumutati temperatuuril 120 °C 24 h argooni keskkonnas. Pärast jahutamist toatemperatuurile pesti toru järjestikku järgmiste ainetega: DMSO, 15% NaOH vesilahus, vesi, 1 M HCl vesilahus, vesi ning atsetoon. Seejärel kuivatati toru vaakumis 4 tunni jooksul temperatuuril 60 °C ja hoiustati see argooni keskkonnas.  $\text{NaBH}_4$  abil redutseeritud PEEK toru redutseeriti seejärel täiendavalt 0,34 mol/l Red-Al lahusega tetraglüümis temperatuuril 80 °C 3 tunni jooksul argooni keskkonnas. Pärast jahutamist toatemperatuurini pesti PEEK toru põhjalikult järgmiste ainetega: THF, 15% NaOH vesilahus, vesi, 1M HCl vesilahus, vesi, metanool ning hekseen ja kuivatati vaakumi abil 4 tunni jooksul temperatuuril 60 °C ning hoiustati seejärel argooni keskkonnas edaspidiseks kasutamiseks.

#### **4.2.3 PEEK toru sisepinna metakrüleerimine**

Viaali lisati veevaba DCE (10,0 ml), metakrüülanhüdriid (1,1 ml) ja DMAP (23,0 mg) ning segu viidi kuivkappi, kus lisati TEA (1,0 ml) ning seejärel tõmmati lahus süstla abil eelnevalt redutseeritud PEEK torusse. PEEK toru suleti alumisest otsast kruviga ning jäeti kuivkappi 12 tunniks toatemperatuuril reageerima. Pärast seda pesti PEEK toru THF-ga ning kuivatati vaakumiga 4 h jooksul ning hoiustati argooni all edaspidiseks kasutamiseks.

#### **4.3 Polü(stüreen-divinüülbenseen) kolonni valmistamine**

Polü(stüreen-divinüülbenseen) kolonni valmistamiseks segati kokku reaktsioonisegu, mis koosnes 24% stüreenist, 16% divinüülbenseenist, 42% dodekanoolist, 18% toluenist (kõik massiprotsendid) ning 1% AIBN (massiprotsent segus oleva stüreeni ja divinüülbenseeni summast). Segu deaereeriti argooni abil 7 minuti jooksul. Polümerisatsioonisegu (300-400 µl, sõltuvalt vooliku pikkusest) tõmmati plastiksüstla abil modifitseeritud PEEK torusse. Üks kolonni otstest suleti PEEK kruviga ning teine ots ühendati 100 µl Hamilton® GASTIGHT® süstlaga, mis oli täidetud umbes 80 µl polümerisatsiooniseguga. Polümerisatsioon viidi läbi rõhu all (umbes 30 bar), mis saavutati asetades 500 g kaaluvihit süstla kolvile. Rõhk on oluline selleks, et saavutada monoliidi võimalikult tihe pakkimine. Reaktsioonisüsteem asetati vertikaalselt vesitermostaati, mis oli eelkuumutatud temperatuurile 65 °C. Polümerisatsioon viidi läbi 3 või 24 tunni jooksul, pärast mida eemaldati kolonn termostaadist ja lasti jahtuda toatemperatuurini. Kolonn lõigati 12,5 cm pikkuseks, lisati ühenduskruvid ning pesti atsetonitriiliga, kasutades HPLC pumpa voolukiirusel 0,05 ml/min 24 h, et eemaldada reageerimata jäänud monomeerid ja poorimoodustaja.

3 tunni jooksul valmistatud kolonne kasutati ainete lahutamiseks ja karakteriseerimiseks. 24 h jooksul valmistatud kolonn selleks ei sobi, sest tekkiv monoliit on radiaalsuunas ebaühtlane: monoliidi keskel on kõva tuumik, samas, kui äärtes on pehmem monoliit. Adhesiooni testimiseks kasutati 24 h jooksul valmistatud kolonni, sest 3 h jooksul valmistatud kolonn pole selleks piisavalt jäik. Kui kasutada pehmemat kolonni selleks, et demonstreerida kui hästi on kolonn seina külge kinnitatud, siis pole võimalik väita, kas rõhu muutus toimus sellest, et monoliit tuli kolonni seinte küljest lahti või sellest, et monoliit oli liiga pehme ning pragunes.

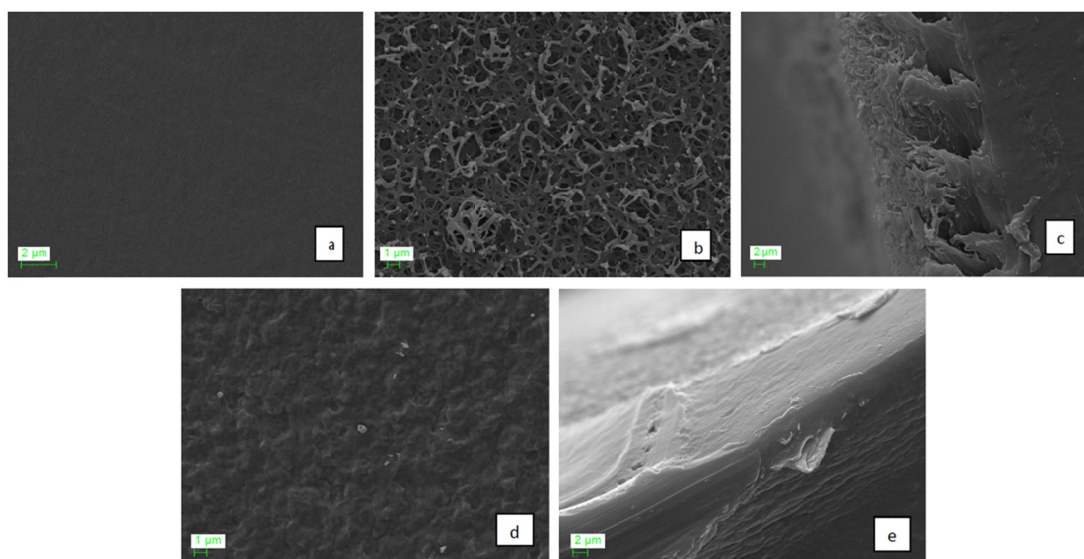
Lämmastiku adsorptsiooni eksperimendiks valmistati monoliit katseklaasis (4,88 mm O.D. x 3,28 mm I.D.) 3 h jooksul. Monoliit lõigati tükkideks ning Soxhlet-ekstraheeriti 24 h jooksul metanooliga ning kuivatati 40 °C juures vaakumi all üleöö.

## 5 Tulemused ja arutelu

### 5.1 PEEK sisepinna modifitseerimine

#### 5.1.1 PEEK toru sisepinna söövitamine

Söövitamine on väga oluline etapp selleks, et PEEK toru sisepind saaks täielikult redutseeritud. PEEK polümeeri pinna välimine kiht on raskemini redutseeritav kui sisu, mistõttu on oluline eemaldada välimine kiht kas mehaaniliselt või keemiliselt, et saavutada kõrge redutseerituse aste. Käesolevas töös kasutati selleks keemilist meetodit, sest PEEK toru sisemust oleks mehaaniliselt keeruline eemaldada. PEEK on küllaltki inertne polümeer. Seetõttu kasutati pinna söövitamiseks kontsentreeritud väävelhapet, mis suudab söövitada PEEK polümeeri toatemperatuuril. Selleks, et vältida pinna liigset söövitamist ja seeläbi PEEK toru mehaanilise tugevuse vähenemist, valiti lühike söövitusae (vähem kui 10 sekundit). Söövituse mõju pinnale on näha SEM fotodelt (Joonis 2). Kui enne töötlemist on PEEK pind sile, siis söövituse tulemusena tekib keeruline kiuline võrgustik. Järgmise etapi ajal toimub söövitatud kihi redutseerimine ja järk-järguline lahustumine DMSO-s, mille tulemusena tekib kompaktne redutseeritud kiht, mille paksus on umbes 10 mikromeetrit. SEM pildilt on näha, et redutseeritud kiht on ebatasasem kui töötlemata PEEK toru. Pinna ebatasasus on hea selleks, et saavutada parem haardumine polümeerse monoliidi ja PEEK toru sisepinna vahel, mis suurendab statsionaarse faasi mehaanilist vastupidavust.



**Joonis 2.** SEM pildid PEEK toru modifitseerimisest. *a – modifitseerimata PEEK, b – söövitatud PEEK, c – ristlõige söövitatud PEEK pinnast, d – redutseeritud PEEK, e – ristlõige redutseeritud PEEK pinnast.*

### 5.1.2 PEEK sisepinna redutseerimine

Pinna redutseerumise ulatuse hindamiseks kasutati IR-spektroskoopiat. Täpsemalt uuriti spektrites (vt Lisa) kahte tüüpilist neeldumismaksimumi:  $1650\text{ cm}^{-1}$  (bensofenoonse karbonüülrühma valentsvõnkumine) ja  $1490\text{ cm}^{-1}$  (fenüleenrühmadele iseloomulik valentsvõnkumine). Neist esimese intensiivsus peaks redutseerimise tulemusena vähenema. Teine maksimum on referentsmaksimum, mille intensiivsus ei muutu redutseerimise jooksul. Redutseerimise ulatuse hindamiseks uuriti neeldumismaksimumide  $1650\text{ cm}^{-1}$  ja  $1490\text{ cm}^{-1}$  intensiivsuste suhet. Redutseeritud derivaadi spektris on näha ka täiesti uut neeldumismaksimumi umbes  $3400\text{ cm}^{-1}$  juures, mis vastab tekkinud hüdroksüülrühmade valentsvõnkumistele. Selle maksimumi teke viitab hüdroksüülrühmade tekkele PEEK pinnal, mis näitab, et karbonüülrühmade redutseerimise protsess on olnud edukas.

Lisaks on spektritelt (Lisa: spektrid b, c) näha, et ilma eelneva söövitamiseta redutseerub PEEK vaid vähesel määral. Piigi intensiivsus lainearvul  $1647\text{ cm}^{-1}$  muutus vähe võrreldes töötlemata PEEK pinnaga. Töötlemata PEEK toru jaoks oli intensiivsuste suhe 0,40 ning pärast redutseerimist  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  (1,2 g/100 ml) lahusega 24 h jooksul temperatuuril  $120^\circ\text{C}$  oli see suhe 0,30, mis näitab, et redutseeriti 25% karbonüülrühmadest. Sarnane tulemus oli ka PEEK toru redutseerimisel Red-Al/tetraglüümi (0,34 mol/l) lahusega 24 h jooksul temperatuuril  $80^\circ\text{C}$ , kui intensiivsuste suhte väärtuseks saadi 0,27, mis näitab, et umbes 32% karbonüülrühmadest redutseeriti ära hüdroksüülrühmadeks. Mõlema redutseerimise juures on spektris (Lisa: b, c) näha ka laiasid neeldumismaksimume  $3400\text{ cm}^{-1}$  juures, mis viitab sellele, et redutseerimine on mingil määral toimunud mõlematel tingimustel.

Happega söövitatud kiht PEEK pinnal reageerib  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  lahusega lihtsasti ning redutseeritud kiht lahustub DMSO-s järkjärgult redutseerimise määra suurenedes. Söövitatud kihi alt välja tulev PEEK kiht redutseerub samuti kergesti. IR-spektrist (Lisa: d) on näha, et neeldumismaksimum  $1647\text{ cm}^{-1}$  juures ( $\text{C}=\text{O}$ ) kadus täielikult ning täiesti uus neeldumismaksimum tekkis  $3400\text{ cm}^{-1}$  juures ( $\text{OH}$ ). See näitab, et pinna redutseerimine oli enam vähem täielik. Spektris (Lisa: d) on näha veel üht täiesti uut neeldumismaksimumi  $1701\text{ cm}^{-1}$  juures, mis näitab, et  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  süsteemiga redutseerimisel on tekkinud uus karbonüülrühm (tõenäoliselt estri karbonüülrühm). Selle tekkepõhjus ei ole selge. Selleks, et redutseerida uued tekkinud karbonüülrühmad kasutati redutseerimiseks tugevamat redutseerimissüsteemi – Red-Al/tetraglüüm lahust, millega töödeldi varasemalt  $\text{NaBH}_4$ -ga redutseeritud PEEK pinda. Spektrist (Lisa: e) on näha, et pärast seda töötlust on



neeldumismaksimum  $1701\text{ cm}^{-1}$  juures kadunud, mis tähendab, et karbonüülrühmad on täielikult redutseerunud.

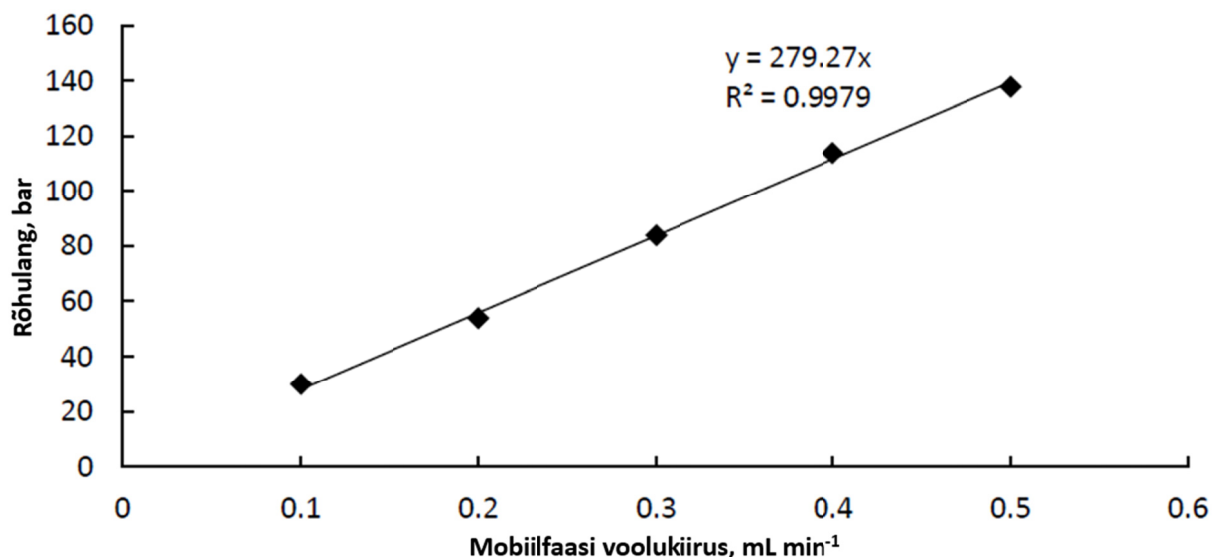
Selleks, et lihtsustada redutseerimise eeskirja, prooviti ka pärast söövitamist kohe redutseerida pinda Red-Al/tetraglüümi lahusega ilma  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  etapita. See ei toonud siiski head tulemust, sest redutseerimisreaktsioonil tekkivad produktid ei lahustu tetraglüümis ning ladestuvad PEEK pinnal ja söövitamisel tekkinud poorset kihti PEEK pinnal polnud võimalik reaktsiooniga eemaldada. Seetõttu on redutseerimiseks kasutusel kaheetapiline redutseerimisprotsess.

### 5.1.3 PEEK pinna vinüleerimine

Metakrüüloülrühmade külgeviimiseks redutseeritud PEEK pinnale kasutati metakrüülanhüdriidi. IR spektrist (Lisa: f) on näha, et reaktsiooni tagajärjel tekkis uus neeldumismaksimum umbes  $1715\text{ cm}^{-1}$  juures, mis kuulub metakrüüloülrühmas oleva karbonüülrühma valentsvõnkumisele, mis näitab, et modifitseerimine oli edukas. Reaktsioonil metakrüülanhüdriidiga on katalüsaatorina kasutusel DMAP. DMAP on tugev katalüsaator esterdamiseks happeanhüdriididega ning sellega on võimalik vinüleerimine läbi viia toatemperatuuril, mis vähendab võimalust, et pinna modifitseerimise käigus tekivad pinnale metakrüülanhüdriidi polümeersed kihid.

## 5.2 Adhesiooni test

Polümeermonoliidi PEEK toru siseseina külge kinnituse hindamiseks kasutati 24 h jooksul polümeriseerunud kolonni. Kinnitumise kvaliteedi hindamiseks uuriti suhet rõhu ja mobiilfaasi voolukiiruse vahel. Kui rõhk tõuseb voolukiiruse tõustes lineaarselt, siis võib väita, et monoliit ei deformeeru rõhu mõjul. Rõhu ja voolukiiruse vahel leiti hea lineaarsus ( $R^2 = 0,9979$ ), vt Joonis 3. Kolonn suudab vastu pidada rõhule 140 bar (voolukiirusel 0,5 ml/min), mis näitab, et monoliit on piisavalt hästi kinnitunud kolonni seintele ning statsionaarne faas pole kokku tõmbunud.



**Joonis 3.** Rõhu ja voolukiiruse suhe

Lisaks määrati ka monoliidi SP väärtus (swelling propensity) [35]. SP faktor määratakse järgmise valemiga:

$$SP = \frac{P(\text{solvent}) - P(\text{vesi})}{P(\text{vesi})} \quad (1)$$

kus  $P$  on mobiilfaasist tuleneva rõhu ja mobiilfaasi viskoossuse suhe. SP faktor iseloomustab materjali pundumist orgaanilistes solventides võrreldes veega. Mida lähemal on SP väärtus nullile, seda vähem materjal pundub orgaanilises solvendis ja seega esineb vähem kokkutõmbumise probleeme. SP määramiseks valmistati kaks kolonni, millest üks modifitseeritud ja teine modifitseerimata PEEK toruga. Orgaaniliseks solvendiks oli atsetonitril. Modifitseerimata kolonni korral oli SP väärtus 6,1, mis näitab, et vee toimel on toimunud statsionaarse faasi kokkutõmbumine ja see on kolonni seinte küljest lahti tulnud. Kui monoliit ei ole seotud kolonni seintega, siis kõrge veesisaldusega solvendis tõmbub monoliit kolonni seintest eemale ja mobiilne faas saab minna seina ja monoliidi vahelt läbi, mis toob kaasa efektiivsuse languse. Modifitseeritud kolonni korral saadi SP väärtus 0,4, mis näitab, et adhesioon statsionaarse faasi ja kolonni seina vahel on tugev ning vee toimel on vaid väga vähesel määral toimunud kokkutõmbumine, mis muudab vaid veidi pooride suurusi.

### 5.3 Temperatuuri mõju polümerisatsioonile

Algselt viidi polümerisatsioon läbi 3 tunni jooksul temperatuuril 60 °C. Sellised tingimused olid varasemalt välja pakutud sulatatud kvartsist kapillaarides sünteesiks. [36] Sellistel tingimustel valmistatud kolonni efektiivsus alküülbenseenide lahutamisel ei olnud piisavalt

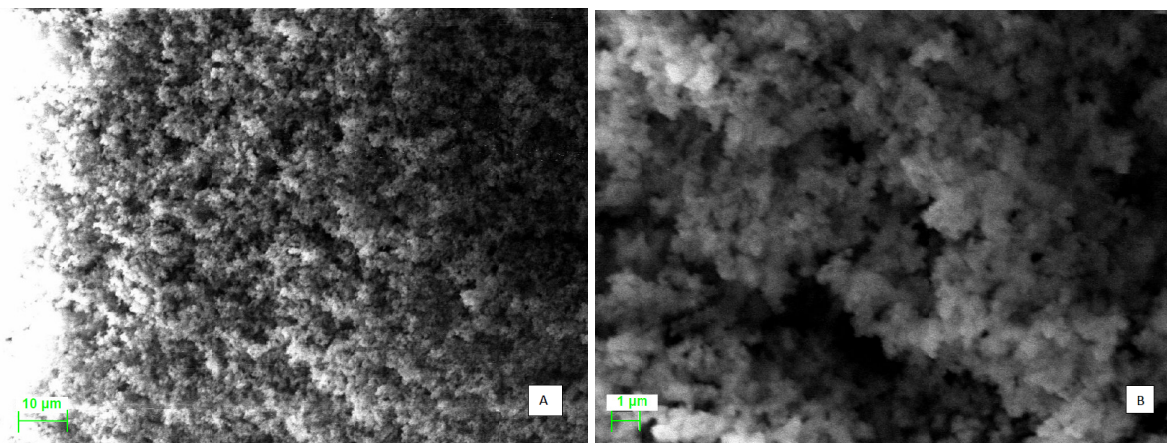
hea, võrreldes sellega, mis oli esitatud kirjanduses. [36] Madalama efektiivsuse põhjuseks võib olla erinev soojusülekanne kapillaaris ja PEEK torus. Sulatatud kvartsi ja PEEK toru soojusjuhtivused on vastavalt  $1,3 \text{ W/(m}\times\text{K)}$  ja  $0,25 \text{ W/(m}\times\text{K)}$ . [37] Lisaks on võrreldavad materjalid erineva paksusega – kapillaar 0,13 mm ja PEEK 0,79 mm. Ka kolonnide sisediameetrit erinevad üksteisest – kapillaaril on see 0,1 mm, kuid PEEK torul 1,59 mm. Järelikult on PEEK torus sünteesi läbi viies soojusülekanne efektiivsus palju madalam kui kvartskapillaari korral. Seega polümerisatsiooni algses staadiumis on reaktsioonisegu temperatuur PEEK torus madalam kui kapillaaris ja seega polümerisatsioon aeglasem. Polümerisatsiooni temperatuuri tõstmine  $5^\circ\text{C}$  võrra ( $65^\circ\text{C}$ ) tõstis märgatavalt kolonni efektiivsust. Polümerisatsiooni temperatuuril  $60^\circ\text{C}$  saadi teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta 9000, kuid temperatuuril  $65^\circ\text{C}$  oli see 32000 taldrikut meetri kohta. Seetõttu kasutati järgenvalt kõigis eksperimentides monoliitide valmistamiseks polümerisatsiooni temperatuuri  $65^\circ\text{C}$ .

#### **5.4 Lämmastiku adsorptsioon**

Monoliidi poorsust uuriti madaltemperatuurse lämmastiku adsorptsiooni meetodiga [38] kasutades kuiva monoliiti. Valmistatud monoliidi mõõtmisel saadi BET eripindalaks  $11,7 \text{ m}^2/\text{g}$ . T-plot meetodil [39] määratud mikropooride ruumala oli  $0,005 \text{ ml/g}$  ja pooride, mille läbimõõt oli alla 370 nm koguruumala oli  $0,031 \text{ ml/g}$ . Selline koguruumala viitab sellele, et alla 370 nm läbimõõduga pooride (sealhulgas ka mesopooride, mille diameeter on 2 kuni 50 nm) hulk kuivas mittepundunud olekus on väike ja enamik poore on makropoorid (läbimõõt üle 370 nm) ning mikromeetri mõõdus gloobulitevahelised poorid. See on ka põhjus, miks saadud statsionaarsete faaside eripindala on küllaltki madal.

#### **5.5 Mikroskoopilised omadused**

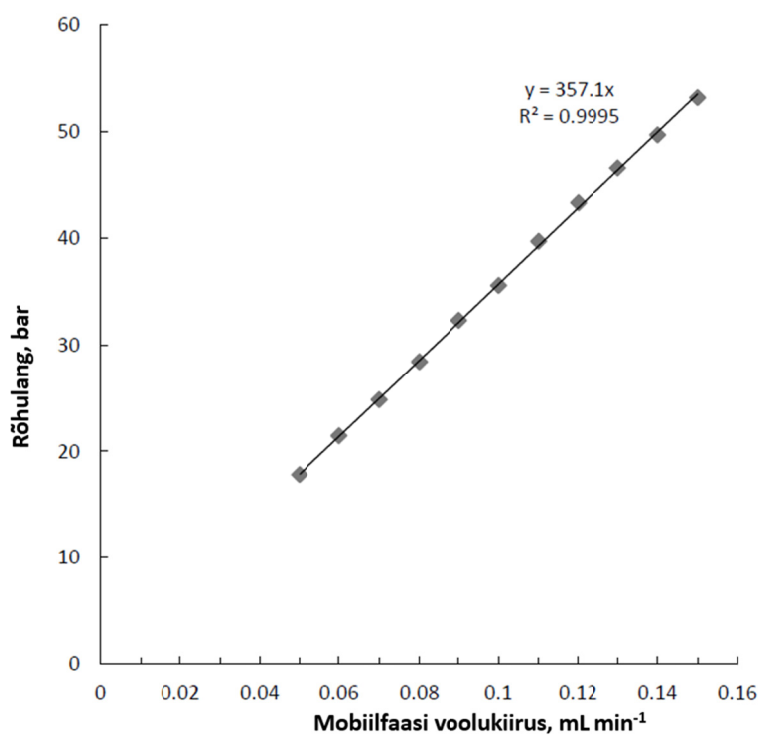
Valmistatud monoliidi morfoloogiat uuriti skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM). SEM fotodelt (Joonis 4) on näha, et valmistatud monoliit koosneb mikrogloobulitest, mis on tüüpiline polümeersetele monoliitidele. Pildilt on näha, et gloobulid on alla mikromeetri suurusel. Omavahel ühendatud gloobulite vahel olevate läbivoolu pooride diameeter varieerub laialdaselt – tosinast mikromeetrist kuni alla mikromeetrise diameetrini. Pooride struktuuri ebaühtlus võib olla põhjuseks ka sellele, miks lahutamisel ei saavutatud veelgi paremat efektiivsust. Kõrge poorsus põhjustab ka kõrge läbilaskvuse, mis on tüüpiline monoliitidele.



**Joonis 4** SEM pildid valmistatud monoliidist

## 5.6 Hüdrodünaamilised karakteristikud ja poorsus

Valmistatud kolonni rõhulangu ja mobiilfaasi voolukiiruse vahelise sõltuvuse (Joonis 5) lineaarsus hea korrelatsioonikoeffitsiendiga ( $R^2 = 0,9995$ ) näitab, et uuritud voolukiiruste ja rõhkude vahemikus ei suru mobiilfaas monoliidi poorset struktuuri elueerumise käigus kokku.



**Joonis 5** Mobiilfaasi voolukiirus vs kolonni rõhulang

Poorse statsionaarse faasi läbilaskvust (*permeability*)  $k_{p,F}$  saab kirjeldada Darcy seaduse abil:

$$k_{p,F} = \frac{\eta u_F L}{\Delta P} \quad (2)$$

kus  $\eta$  on mobiilfaasi viskoossus,  $u_F$  on mobiilfaasi mahtkiiruse  $F_V$  ja kolonni ristlõikepindala suhe,  $L$  on kolonni pikkus ja  $\Delta P$  on kolonnile rakenduv rõhulang. Mobiilfaasi viskoossuse väärtus  $\eta = 0,60$  cP atsetonitriil/vesi (70/30, v/v) süsteemi jaoks, võeti kirjandusest. [40] Testitud kolonni läbilaskvuseks arvutati  $1,7 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ , mis viitab monoliidi heale läbilaskvusele.

Monoliidi poorsust  $\varepsilon_t$  hinnati, kasutades järgnevat valemit (3):

$$\varepsilon_t = \frac{u_F}{u_0} \quad (3)$$

Kus  $u_0$  on mobiilfaasi joonkiirus, mis on määratud kolonniga mitteseostuva ühendi abil. [9] Selles töös kasutati kolonniga mitteseostuva ühendina tioureat. Valmistatud monoliidi jaoks oli  $\varepsilon_t$  väärtus 0,94, mis on sarnane väärtusele kirjanduses. [36]

## 5.7 Alküülbenseenide lahutamine ning kolonnide reprodutseeritavus

Kolonnide reprodutseeritavuse hindamiseks valmistati samade tingimuste juures 5 kolonni viiel erineval päeval (4 kuu jooksul). Kolonnide lahutamisevõime hindamiseks lahutati isokraatiliselt alküülbenseene (benseen, toluen, etüülbenseen, propüülbenseen, butüülbenseen ja pentüülbenseen). Lahutuse surnud aja identifitseerimiseks lisati segusse tiourea, mis ei seostu pöördfaas-kolonniga. [20] Pöördfaaskromatograafia jaoks kasutati mobiilse faasina atsetonitriil-vesi 70:30, (v/v) segu. Joonis 6 demonstreerib tüüpilist kromatogrammi. Mahtuvusfaktorid, rõhud ja saadud teoreetiliste taldrikute arv iga kolonni jaoks on toodud Tabelis 1. Suhtelise standardhälbe väärtused rõhu ja mahtuvusfaktorite jaoks olid head: vastavalt 3,3% ja vahemikus 2,2-2,6%. Alküülbenseenide lahutamisel leitud teoreetiliste taldrikute arvude suhtelise standardhälve (11,5-21,4% N/m) oli suurem, kuid siiski vastuvõetav. Need tulemused kinnitavad, et eeltoodud eeskiri monoliitsete kolonnide valmistamiseks on reprodutseeritav.

**Tabel 1. Kolonnide valmistamise korratavus.**

	Rõhk (bar)	Benseen		Tolueen		Etüül- benseen		Propüül- benseen		Butüül- benseen		Pentüül- benseen	
		k	N/m	k	N/m	k	N/m	k	N/m	k	N/m	k	N/m
<b>Kolonn 1</b>	31,3	1,08	17200	1,58	18000	2,14	20500	3,00	20400	4,38	20700	6,36	20200
<b>Kolonn 2</b>	33,5	1,05	24400	1,55	24400	2,10	25100	2,94	25000	4,30	26000	6,25	25200
<b>Kolonn 3</b>	32,6	1,10	16800	1,62	15200	2,19	15200	3,07	17500	4,48	21200	6,50	20100
<b>Kolonn 4</b>	30,8	1,03	21200	1,53	19500	2,07	19100	2,90	19300	4,24	20900	6,17	24900
<b>Kolonn 5</b>	31,9	1,04	17300	1,53	15800	2,08	15400	2,92	15300	4,26	15800	6,19	20900
<b>Keskmine</b>	32,0	1,06	19400	1,56	18600	2,11	19000	2,96	19500	4,33	20900	6,29	22200
<b>RSD%</b>	3,3	2,6	17,0	2,4	19,8	2,3	21,4	2,3	18,6	2,2	17,3	2,2	11,5

Kolonna pikkus: 125 mm. Mobiilne faas: 70% (v/v) atsetonitriil vees. Joonkiirus: 0,65 mm s<sup>-1</sup>.  
Süsti ruumala: 0,5 µL. Analüütiline lainepikkus: 210 nm.

Kõikide analüütide jaoks koostati ka van Deemteri kõverad, kasutades ühte viiest kolonnist. Tulemusi kajastavad Tabel 2 ja Joonis 7. Kuigi analüütide mahtuvusfaktorite väärtused on vahemikus 1-6, siis van Deemteri kõverad on oma kujult väga sarnased. Teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta optimaalsel voolukiirusel on vahemikus 26000 kuni 32000. Kõige suurem teoreetiliste taldrikute arv oli 31400 taldrikut meetri kohta, mis vastab 31,9 µm teoreetilise taldriku kõrgusele. Selliseid teoreetiliste taldrikute arvu madala molekulmassiga ühendite lahutamisel võib lugeda väga headeks, võrreldes kirjanduses leiduvate sarnaste kolonnidega [41], kus teoreetiliste taldrikute arv on üldiselt alla 20 000 taldriku meetri kohta.

**Tabel 2. Retentsioonifaktorid (*k*), eksperimendiandmetest leitud van Deemteri konstandid (*A*, *B* ja *C*), optimaalne joonkiirus, teoreetiliste taldrikute kõrgused ja teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta.**

Analüüt	k	A	B	C	U <sub>opt</sub> (mm/s)	HETP <sub>min</sub> (µm)	Efektiivsus (N/m)
Benseen	1,05	13,7	3,26	44,7	0,27	37,8	26400
Tolueen	1,56	11,6	3,02	50,3	0,25	36,2	27600
Etüülbenseen	2,11	11,0	2,83	46,6	0,25	34,0	29400
Propüülbenseen	2,96	9,1	2,63	50,7	0,23	32,2	31000
Butüülbenseen	4,33	7,8	2,77	52,4	0,23	31,8	31400
Pentüülbenseen	6,29	12,8	1,93	47,4	0,20	31,9	31300

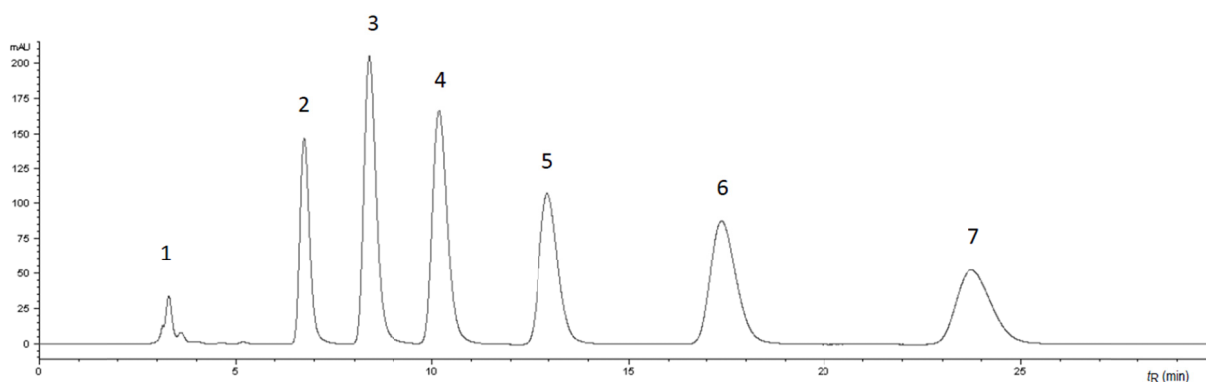
Kolonna pikkus: 125 mm. Mobiilne faas 70% (v/v) atsetonitriil vees. Süsti ruumala: 0,5 µL.

Analüütiline lainepikkus: 210 nm. Efektiivsus määratud optimaalsel joonkiirusel.

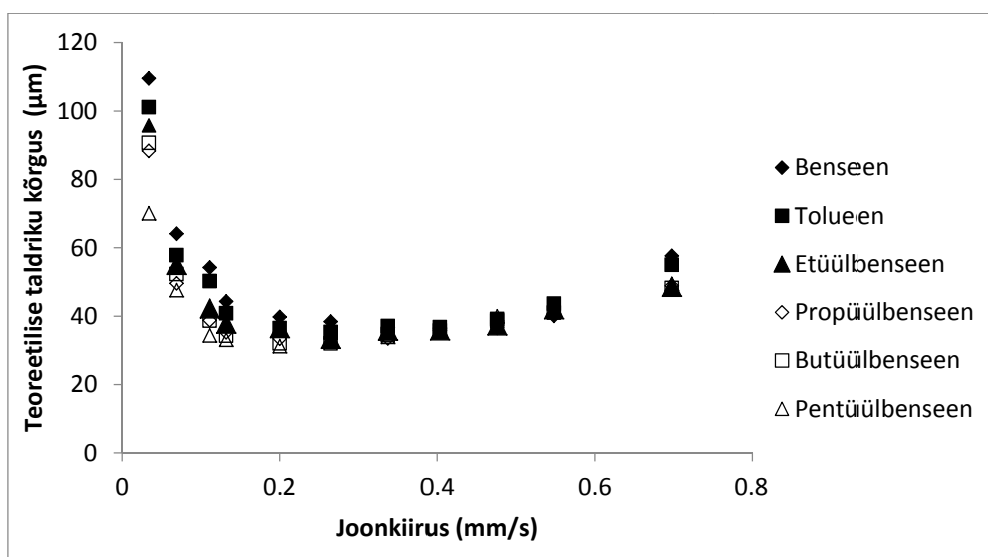
Van Deemteri konstantide leidmiseks registreeriti alküülbenseenide segu kromatogrammid erinevatel mobiilfaasi voolukiirustel. Iga aine jaoks leiti igal voolukiirusel teoreetiliste taldrikute arv ja saadud sõltuvusi lähendati vähimruutude meetodil van Deemteri võrrandiga.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (4)$$

Toodud kromatogrammil (Joonis 6) on mõnede piikide puhul näha mõningat asümmeetriat. Piigi kuju sõltuvust analüüdi kontsentratsioonist uuriti, et teha kindlaks, kas asümmeetria tuleneb kolonni ülekoormamisest prooviga. Leiti, et kolonni efektiivsus muutus väga vähe, kui analüütide kontsentratsioon muutus 10-300 µg/ml, seega ei ole asümmeetria tingitud kolonni prooviga ülekoormamisest. Kõige tõenäolisemaks põhjuseks on massiülekande mõningane takistus väikeste molekulide korral geelilaadsetes polümeerse monoliidi osades, kui see on solvateeritud ja pundunud mobiilse faasi tõttu. [36]



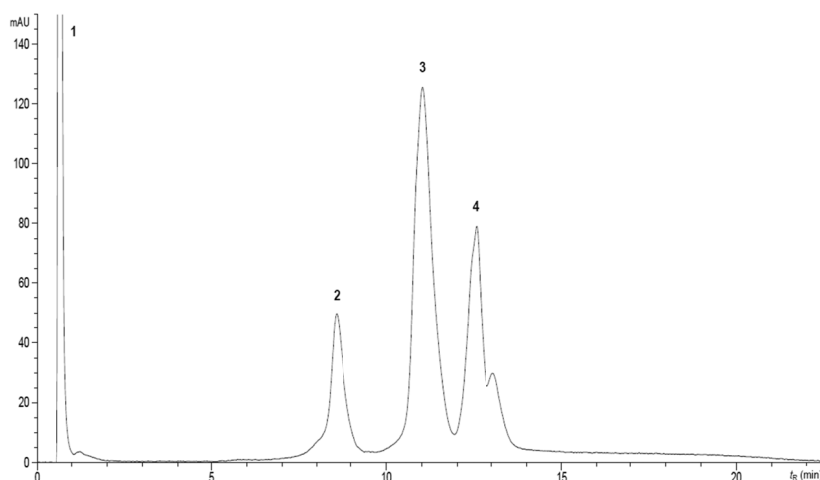
**Joonis 6** Alküülbenseenide lahutamine isokraatiliselt. 1 – tiouurea, 2 – benseen, 3 – toluen, 4 – etüülbenseen, 5 – propüülbenseen, 6 – butüülbenseen, 7 – pentüülbenseen.



**Joonis 7** Alküülbenseenide lahutamisel saadud Van Deemteri kõverad.

## 5.8 Valkude lahutamine

Lisaks madala molekulmassiga ühenditele katsetati kolonni lahutamisvõimet ka kolme valguga – veise seerumi albumiin (BSA), trüpsiin ja papaiin (Joonis 8). Uuritud valkude molekulmasside vahemik oli 23,3 kDa kuni 66,5 kDa. Teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta oli trüpsiinil 24 000 (vastab teoreetilise taldriku kõrgusele 41,6  $\mu\text{m}$ ), papaiinil 22 000 (44,9  $\mu\text{m}$ ) ja BSA korral 40 000 (24,3  $\mu\text{m}$ ). Mahtuvusfaktorid olid trüpsiini, papaiini ja BSA jaoks vastavalt 12, 16 ja 18. BSA-le vastava piik nr 4 küljes on näha madalamat lisapiiki, mis on põhjustatud sellest, et kommertsiaalne BSA sisaldab lisaks monomeerile ka dimeeri, trimeeri ja teisi agregate. [42] Saadud tulemustest on näha, et valmistatud kolonniga on võimalik lisaks madalmolekulaarsetele ühenditele lahutada ka makromolekule. Samas on sellisel viisil valmistatud kolonn siiski mõeldud eeskätt madalmolekulaarsete ühendite lahutamiseks. Sarnaseid kolonne oleks võimalik valmistada ka suunitlusega makromolekulide lahutamiseks, kui muuta reaktsioonitingimusi. Reaktsiooniaja pikendamine võimaldaks saada tugevamat monoliiti, mis peab vastu kõrgematele rõhkudele. Lisaks muudab see pooride jaotust bimodaalsest monomodaalseks, nagu üldiselt makromolekulide lahutamisel kasutatakse. Samas pikk reaktsiooniaeg ei ole hea madalmolekulaarsete ühendite lahutamiseks, sest selle tulemusena tekib keskele kõva tuumik ning äärtest on monoliit pehmem, mistõttu lahutamisel läheb analüüt sügavale statsionaarse faasi pooridesse, mis pole efektiivsusele hea. Kuna kõik reaktsioonitingimused mõjutavad lõpuks saadavat monoliiti, siis tuleks teha mitmeid eksperimente, et teha kindlaks, millised reaktsioonitingimused ja polümerisatsioonisegu sisaldused on parimad selleks, et saavutada soovitud omadustega monoliitseid statsionaarseid faase.



**Joonis 8** Valkude gradientelueerimine. 1 – surnud ajal välja tulnud lisandid, 2 – trüpsiin, 3 – papaiin, 4 – BSA.



## 6 Kokkuvõte

Käesoleva töö raames töötati välja uus reprodutseeritav meetod polü(stüreen-divinüülbenseen) põhiste monoliitsete kolonnide valmistamiseks PEEK torus. Valmistatavad kolonnid on sisediameetriga 1,6 mm ning on kasutatavad tavapäraste HPLC seadmetega. Oluline etapp polümeersete monoliitsete kolonnide valmistamisel on monoliidi kovalentne kinnitamine kolonni seinte külge, et vältida monoliidi seinte küljest lahti tulemist, mis põhjustab efektiivsuse olulist langust. Monoliidi kolonni siseseina külge kinnitamiseks on vaja PEEK sisepinda keemiliselt töödelda. Välja töötatud meetod koosneb kolmest etapist, milleks on sisepinna söövitamine, karbonüülrühmade redutseerimine ning vinüülrühmade kinnitamine kolonni siseseinale, mille kaudu monoliit kinnitub kolonni seinte külge. Karbonüülrühmade redutseerimine viidi läbi uudselt kahes etapis, et saavutada kõrge redutseerituse aste. PEEK toru modifitseerimise edukus tõestati läbi ATR-IR mõõtmiste ning monoliidi kolonni seinte külge sidumine läbi rõhulangu mõõtmiste. Kolonni lahutamisomadusi uuriti läbi kromatograafiliste eraldamiste. Valmistatud kolonnide efektiivsus alküülbenseenide lahutamisel ulatus kuni 32000 taldrikuni meetri kohta ning valkude lahutamisel oli vahemikus 23000 – 40000. Kolonnide valmistamise reprodutseeritavust demonstreeriti läbi alküülbenseenide isokraatilise lahutamise.

Käesoleva töö tulemustest on kirjutatud artikkel, mis on 18.05.2016 lõplikult avaldamiseks vastu võetud ajakirjas *Analytica Chimica Acta* (DOI: 10.1016/j.aca.2016.05.026).

## 7 Summary

### **Synthesis and testing of monolithic poly(styrene-divinylbenzene) stationary phases in PEEK tubing**

A novel and reproducible method for preparing poly(styrene-divinylbenzene) monolithic columns in PEEK tubing has been developed. The method enables preparation of columns with internal diameter of 1,6 mm, which are compatible with conventional HPLC equipment. The key step in the preparation of monolithic columns is covalent attachment of the monolith to column inner surface. This is because the detachment of monolith from column walls during separation processes causes remarkable decrease in separation efficiency. In order to covalently attach the monolith to the inner PEEK column surface, the surface needs to be chemically modified. In this work, a three step procedure has been used. It consists of surface etching, reduction of carbonyl groups and attaching vinyl groups to the surface, to which the monolith can be covalently attached. As a novelty, the reduction step is carried out in two reactions to achieve a high reduction degree. The success of PEEK surface modification and binding with monoliths was demonstrated by ATR-IR spectra and pressure drop measurements. The separation properties of the prepared columns were investigated via chromatographic separations. The efficiency for separation of alkylbenzenes reached 32000 plates per meter and for the separation of proteins it was from 23000 to 40000 plates per meter. The reproducibility of the column preparation method was demonstrated by isocratic separation of alkylbenzenes.

Based on the results of this work, a manuscript has been accepted for publication in *Analytica Chimica Acta* as of 18.05.2016 (DOI: 10.1016/j.aca.2016.05.026).

## 8 Kasutatud kirjandus

1. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Skoog and West's Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed.; Brooks Cole, a division of Cengage Learning, 2013.
2. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 1997.
3. Bonn, G.; Ligon, S. C. *Method for covalently attaching polymeric monoliths to polyether ether ketone (peek) surfaces*. WO2011073446 A1. 2011.
4. Svec, F.; Huber, C. G. Monolithic materials. Promises, challenges, achievements. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2100-2108.
5. Wang, P. G. *Monolithic Chromatography and Its Modern Applications*; ILM Publications, 2010.
6. Li, Y.-M.; Liao, J. L.; Nakazato, K.; Mohammad, J.; Terenius, L.; Hjerten S. Continuous beds for microchromatography: cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 153-158.
7. Nischang, I.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. Downscaling limits and confinement effects in the miniaturization of porous polymer monoliths in narrow bore capillaries. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7390-7396.
8. Peters, E. C.; Svec, F.; Frechet, J.M. J. Preparation of large-diameter “molded“ porous polymer monoliths and the control of pore structure homogeneity. *Chem Mater.* **1997**, *9*, 1898-1902.
9. Nischang, I.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. Effect of capillary cross-section geometry and size on the separation of proteins in gradient mode using monolithic poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) columns. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 2355-2361.
10. Diaz-Bao, M.; Barreiro, R.; Miranda, J. M.; Cepeda, A.; Regal, P. Recent advances and uses of monolithic columns for the analysis of residues and contaminants in food. *Chromatography.* **2015**, *2*, 79-95.
11. Mould, D. L.; Synge, R. L. M. Elektrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules. *Analyst.* **1952**, *77*, 964-970.
12. Svec, F.; Frechet, J. M. J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820-822.

13. Wang, Q. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2243-2248.
14. Fields, S. Silica xerogel as a continuous column support for high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2709-1712.
15. Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498-3501.
16. Guiochon, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography *J. Chromtogr. A.* **2007**, *1168*, 101-168.
17. Atia, N. N.; York, P.; Clark, B. J. Comparison between monolithic and particle-packed platinum C18 columns in HPLC determination of acidic and basic test mixtures. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2732-2736.
18. Jerkovich, A. D.; Mellors, J. S.; Jorgenson, J. W. The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography. *LCGC Asia Pacific.* **2003**, *6*, 8-12.
19. Liu, K.; Aggarwal, P.; Lawson, J. S.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2767-2781.
20. Smirnov, N.; Dyatchkov, I. A.; Telnov, M. V.; Pirogov, A. V.; Shpigun, O. A. Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic rod columns for separation of small molecules. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 5010-5019.
21. Loog, O., Timotheous, H.; Järv, J. *Orgaanilised polümeerid*. Tartu Ülikooli Kirjastus, 2012.
22. Shibuya, N.; Porter, R. S. Kinetics of PEEK sulfonation in concentrated sulfuric acid. *Macromolecules* **1992**, *25*, 6495-6499.
23. Karcha, R. J.; Porter, R. S. Preparation and Characterization of Nitrated Poly(Aryl Ether Ketone). *J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem.* **1995**, *32*, 957-967.

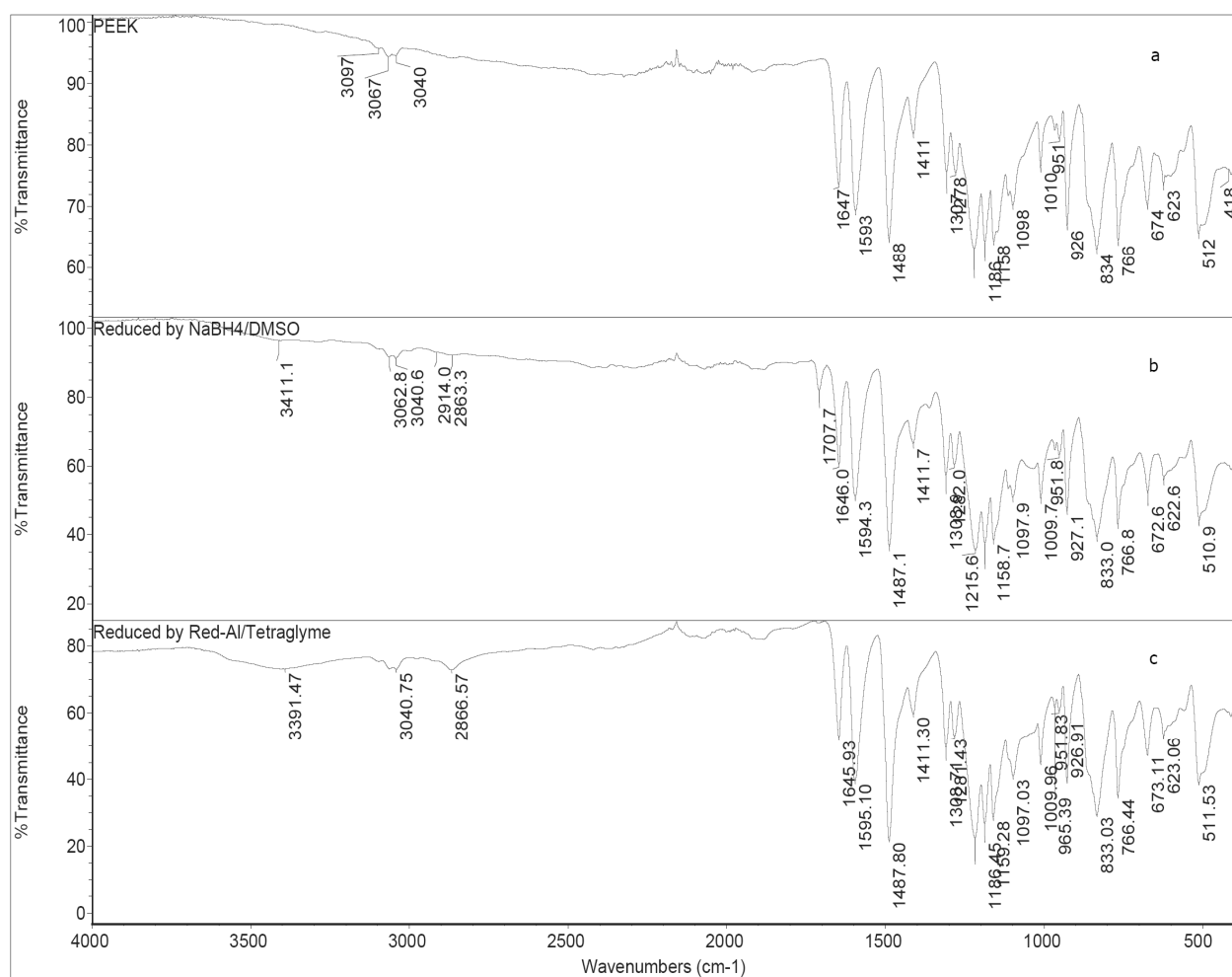
24. Diez-Pascual, A. M.; Martinez, G.; Gomez, M.A. Synthesis and characterization of poly(ether ether ketone). Derivatives obtained by carbonyl reduction. *Macromolecules* **2009**, *42*, 6885-6892.
25. Noiset, O.; Henneuse, C.; Schneider, Y.-J.; Marchand-Brynaert, J. Surface reduction of poly(aryl ether ether ketone) film: UV spectrophotometric, <sup>3</sup>H radiochemical, and X-ray photoelectron spectroscopic assays of the hydroxyl functions. *Macromolecules* **1997**, *30*, 540-548.
26. Franchina, N.L.; McCarthy, T.J. Surface modifications of poly(ether ether ketone). *Macromolecules*. **1991**, *24*, 3045-3049.
27. Shu, S.; Kobayashia, H.; Okubo, M.; Sabarudin, A.; Butsugan, M.; Umemura, T. Chemical anchoring of lauryl methacrylate-based reversed phase monolith to 1/16" o.d. polyetheretherketone tubing. *J. Chromatogr. A*. **2012**, *1242*, 59-66.
28. Fekete, S.; Veuthey, J.-L.; Eeltink, S. Comparaative study of recent wide-pore materials of different stationary phase morphology, applied for the reversed-phase analysis of recombinant monoclonal antibodies. *Anal Bioanal Chem.* **2013**, *405*, 3137-3151.
29. Ciborowski, P.; Silberring, J. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry. The Crossroads*. 2nd ed.; Elsevier, 2016.
30. Urban, J.; Jandera, P. Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2521-2540.
31. Vlach, E. G.; Tennikova, T. B. Preparation of methacrylate monoliths. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 2801-2813.
32. Viklund, C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. Monolithic, "Molded", porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: control of porous properties during polymerization. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 744-750.
33. Svec, F.; Frechet, J. M. J. Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "Molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis. *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 707-715.
34. Vahur, S.; Teearu, A.; Leito, I. ATR-FT-IR spectroscopy in the region of 550–230 cm<sup>-1</sup> for identification of inorganic pigments. *Spectrochim. Acta, Part A* . **2010**, *75*, 1061-1072.
35. Lubbad, S. H.; Buchmeiser, M. R. Fast separation of low molecular weight analytes on structurally optimized polymeric capillary monoliths. *J. Chromatogr. A*. **2010**, *1217*, 3223-3230.

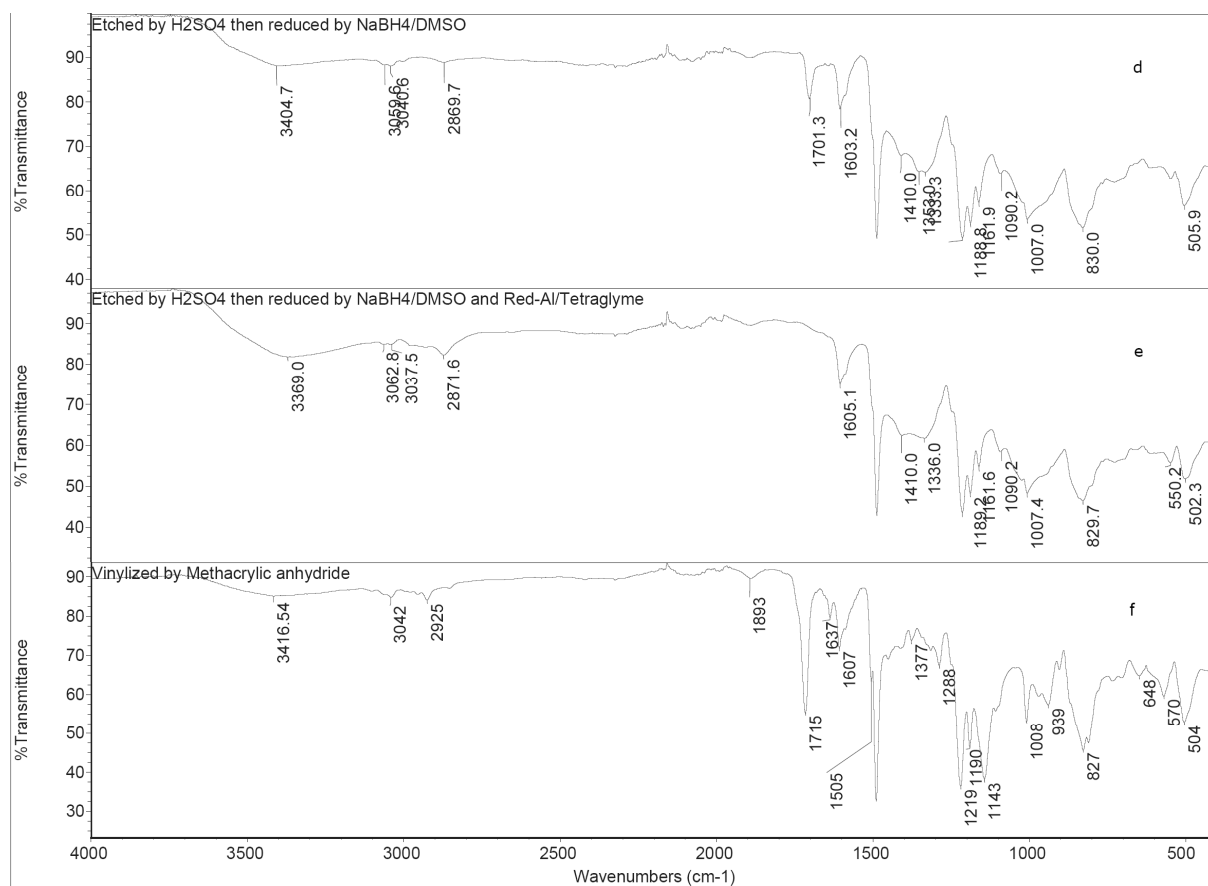
36. Nischang, I.; Teasdale, I.; Brueggemann, O. Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 7514-7522.
37. Nesterenko, E.P.; Nesterenko, P. N.; Connolly, D.; Lacroix, F.; Paull, B. Micro-bore titanium housed polymer monoliths for reversed-phase liquid chromatography of small molecules. *J. Chromatogr. A.*, **2010**, *1217*, 2138-2146.
38. Sing, K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids Surf., A.* **2001**, *187-188*, 3-9.
39. Galarneau, A.; Villemot, F.; Rodriguez, J.; Fajula, F.; Coasne, B. Validity of the t-plot method to assess microporosity in hierarchical micro/mesoporous materials. *Langmuir.* **2014**, *30*, 13266-13274.
40. Wode, H.; Seidel, W. Precise viscosity measurements of binary liquid mixtures of acetonitrile-water and 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone-water. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 927-934.
41. Nischang, I. On the chromatographic efficiency of analytical scale column format porous polymer monoliths: Interplay of morphology and nanoscale gel porosity *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1236*, 152-163.
42. Frutos, M.; Cifuentes, A.; Diez-Masa, J. C. Multiple peaks in HPLC of proteins: bovine serum albumin eluted in a reversed-phase system. *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 18-24.

## 9 Lisa

ATR-FT-IR spektrid PEEK pinnast modifitseerimise erinevatel etappidel

- Modifitseerimata PEEK toru
- Redutseeritud ainult  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  süsteemiga
- Redutseeritud ainult Red-Al/Tetraglüm süsteemiga
- Söövitatud kontsentreeritud väävelhappega, seejärel redutseeritud  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  süsteemiga
- Söövitatud kontsentreeritud väävelhappega, seejärel redutseeritud  $\text{NaBH}_4/\text{DMSO}$  ja Red-Al/Tetraglüm süsteemidega
- Vinüliseeritud metakrüülanhüdriidiga







## **Polü(stüreen-divinüülbenseen) monoliitsete statsionaarsete faaside süntees PEEK kolonnis ja nende testimine**

Käesoleva töö raames töötati välja kolmeetapiline meetod PEEK toru modifitseerimiseks, mis võimaldab siduda monoliitse statsionaarse faasi keemiliselt kolonni seinte külge. Meetod koosneb söövitamisest, redutseerimisest ja vinüleerimisest, seejuures on redutseerimise etapp viidud läbi uudselt kahe erineva reaktsioonina, et saavutada kõrge redutseerituse aste. Valmistatud kolonnid (sisediameter 1,6 mm, pikkus 12,5 cm) on kasutatavad tavapäraste HPLC seadmetega. Modifitseeritud PEEK kolonni sünteesiti *in situ* polü(stüreen-divinüülbenseen) monoliit. Monoliidi seinte külge kinnitamise edukust hinnati erinevate rõhulangu mõõtmistega. Statsionaarse faasi lahutamisevõimet hinnati alküülbenseenide ning valkude kromatograafiliste eraldamistega. Valmistatud kolonnide reprodutseeritavus tõestati alküülbenseenide isokraatilisel eraldamisel. Teoreetiliste taldrikute arv meetri kohta oli optimaalsel voolukiirusel alküülbenseenide lahutamisel 26000 kuni 32000 erinevate analüütide jaoks.

Märksõnad: Polü(stüreen-divinüülbenseen), PEEK, monoliitne kolonn, RP-HPLC

### **Synthesis and testing of monolithic poly(styrene-divinylbenzene) stationary phases in PEEK tubing**

A new three-step method for PEEK tubing surface modification is presented, which is essential for covalently anchoring the monolith to PEEK tubing. The method includes etching, surface reduction and surface vinylization. As a novelty, the reduction process is carried out in two steps to achieve a high degree of reduction. The prepared columns (internal diameter 1,6 mm, length 12,5 cm) are usable with conventional HPLC equipment. Poly(styrene-divinylbenzene) monoliths were synthesized *in situ* into the modified PEEK tubing. Successful binding of the monolith with PEEK tubing was demonstrated by pressure drop measurements. Separation properties of the obtained stationary phases were evaluated via chromatographic separation of alkylbenzenes and proteins. The column performance was evaluated via isocratic separation of a series of alkylbenzenes, which showed the current method to be reproducible. The numbers of plates per meter at optimal flow rate were found to be between 26000 and 32000 for different analytes.

Keywords: Poly(styrene-divinylbenzene), PEEK, monolithic column, RP-HPLC

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Jaana Heiter

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Polü(stüreen-divinüülbenseen) monoliitsete statsionaarsete faaside süntees PEEK kolonnis ja nende testimine,

mille juhendajad on PhD Chunguang Lu ja Prof Ivo Leito.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016